

THÈSE

PRÉSENTÉE

DEVANT L'UNIVERSITÉ CLAUDE BERNARD

A LYON

POUR OBTENIR

LE TITRE DE DOCTEUR INGÉNIEUR

PAR

Madame Annie-France PRIGENT

Ingénieur Biochimiste INSA

SYNTHÈSE ET ACTIVITÉ BIOLOGIQUE DE COMPOSÉS APPARENTÉS AUX CARDÉNOLIDES

Soutenue le 9 Juillet 1971 devant la Commission d'Examen :

MM. J. CHOPIN . . .	Président
H. PACHECO . . .	} Examinateurs
A. CIER . . .	
Mlle A. GROUILLER. .	

LYON

1971

THÈSE

PRÉSENTÉE

DEVANT L'UNIVERSITÉ CLAUDE BERNARD

A LYON

POUR OBTENIR

LE TITRE DE DOCTEUR INGÉNIEUR

PAR

Madame Annie-France PRIGENT

Ingénieur Biochimiste INSA

SYNTHÈSE ET ACTIVITÉ BIOLOGIQUE DE COMPOSÉS APPARENTÉS AUX CARDÉNOLIDES

Soutenue le 9 Juillet 1971 devant la Commission d'Examen :

MM. J. CHOPIN . . .	Président
H. PACHECO . . .	} Examinateurs
A. CIER . . .	
Mlle A. GROUILLER. .	

LYON

1971

THÈSE

PRÉSENTÉE

POUR L'OBTENTION DU DEGRÉ DE DOCTEUR

EN MÉDECINE

PAR

LE TITRE DE DOCTEUR EN MÉDECINE

PAR

Monsieur le Docteur en Médecine

LEONARDUS VAN DER WERF

SYNTHÈSE ET ACTIVITÉ BIOLOGIQUE

DE COMPOSÉS

APPARTENANT À LA CLASSE DES CARDÉNOLES



Présentée à la Faculté de Médecine de l'Université de Leiden

le 15 Mars 1925

Par

le Docteur

LEONARDUS VAN DER WERF

1925

1925

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD

LYON

Président : M. le Professeur J. BOIDIN.

1er Vice-Président : M. R. TOURAINÉ, Maître de Conférences agrégé.

2ème Vice-Président : M. P. PONCET, Maître-Assistant.

3ème Vice-Président : M. D. SETTELEN, Etudiant.

UNITES D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE

<u>UNITES</u>	<u>DIRECTEURS</u>
U.E.R. médicale Grange-Blanche	M. le Professeur D. GERMAIN
U.E.R. médicale Alexis-Carrel	M. le Professeur C. GIROD
U.E.R. médicale LYON-Nord	M. le Professeur A. BERTOYE
U.E.R. médicale LYON-Sud-Ouest	M. le Professeur L. TOLOT
U.E.R. des Sciences pharmaceutiques	M.M. CARRAZ, Maître de Conférences agrégé
U.E.R. des Techniques de Réadaptation	M. le Professeur P. MOUNIER-KÜHN
U.E.R. de Biologie humaine	M. J.C. CZYBA, Maître de Conférences agrégé
Institut Régional d'Education Physique et Sportive	M. J. SAPIN, Professeur E.P.S.
U.E.R. de Mathématiques	M. le Doyen J. BRACONNIER
U.E.R. de Physique	M. le Professeur M. DUFAY
U.E.R. de Chimie et Biochimie	M. le Professeur D. GAUTHERON
U.E.R. des Sciences de la Nature	M. le Professeur L. DAVID
U.E.R. de Biodynamique et Psychopédagogie	M. le Professeur J. CHANEL
U.E.R. de Physique nucléaire	M. le Professeur A. SARAZIN
Institut Universitaire de Technologie I	M. le Professeur L. FEUVRAIS
Institut Universitaire de Technologie II	M. J. GALLET
Observatoire	M. le Professeur J.H. BIGAY

Secrétaire Général : M. P. IZAUTE



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41552624_0007

A MA MERE

A MON MARI

A MA FILLE

A MONSIEUR H. PACHECO

Professeur de la Faculté des Sciences de LYON
Directeur du Service de Chimie biologique
a l'Institut National des Sciences Appliquées de LYON

En témoignage de profonde et respectueuse gratitude.

AVANT - PROPOS

Ce travail a été effectué de 1967 à 1971 dans le laboratoire de Chimie Biologique de l'Institut National des Sciences Appliquées de LYON, sous la direction de Monsieur le Professeur H. PACHECO.

Nous tenons tout d'abord à lui exprimer notre profonde reconnaissance pour la constante sollicitude avec laquelle il a guidé nos travaux, pour le dynamisme et le goût de l'effort qu'il sait communiquer à ses chercheurs afin de surmonter les difficultés et aller toujours de l'avant.

Nous présentons nos respectueux remerciements à Monsieur le Professeur J. CHOPIN qui a bien voulu nous faire l'honneur de présider notre jury.

Nous exprimons aussi une vive et sincère reconnaissance à Monsieur le Professeur A. CIER qui a bien voulu accepter de faire partie de ce jury et qui a dirigé dans le laboratoire de Pharmacie Chimique de la Faculté de Médecine et de Pharmacie, l'expérimentation pharmacologique.

Nos remerciements s'adressent également à Mademoiselle A. GROUILLER, chargée de recherche au C.N.R.S., qui m'a guidée avec dévouement par ses conseils judicieux, tout au long de la réalisation de ce travail.

Nous remercions également le personnel du laboratoire C.N.R.S. de Micro-Analyse de la Chaire de Chimie Organique de la Faculté des Sciences de LYON.

Que nos camarades de laboratoire trouvent ici l'expression de notre amicale sympathie et tout particulièrement Monsieur Claude ROULET pour son aide précieuse dans la réalisation de la partie biochimique de ce travail.

1. INTRODUCTION

ETAT DES CONNAISSANCES ACTUELLES SUR LA CHIMIE ET LA PHARMACOLOGIE DES CARDENOLIDES

PLAN

- 1.1 Les hétérosides cardiotoniques
- 1.2 Les principales relations structure-activité
- 1.3 Les principaux cardénolides naturels connus
- 1.4 Synthèse de cardénolides naturels
- 1.5 Synthèse d'analogues non naturels des cardénolides
- 1.6 Métabolisme des glycosides cardiotoniques
 - Mécanisme d'action biochimique
- 1.7 Présentation de notre travail

Le travail présenté ci-après a pour but la synthèse et l'étude biochimique de composés apparentés aux cardénolides.

Les cardénolides (1, Figure 1), encore appelés glycosides cardiotoniques, terme plus général qui inclut aussi les bufadiénolides (2, Figure 1) sont des composés d'origine végétale, à action spécifique sur le coeur. Les glycosides cardiotoniques ont une action particulièrement puissante et se caractérisent par le fait qu'ils agissent à très faible dose chez l'homme ou chez l'animal. Une très petite quantité de ces substances (2,5 mg par Kg chez l'homme) exerce une action thérapeutique sur le coeur déficient mais une dose excessive provoque la mort par arrêt du coeur en systole (1).

Les glycosides cardiotoniques se trouvent en très petites quantités dans les tiges, les feuilles, les racines de plantes très largement distribuées au point de vue géographique. On les trouve particulièrement chez les Apocynacées, les Scrophulariacées, les Liliacées, les Moracées, et les Renonculacées.

De nombreuses espèces poussent dans les régions tropicales et ont été très tôt utilisées par les indigènes d'Afrique et d'Amérique du sud pour les préparations de poisons dont ils se servaient pour chasser ou se battre. Les Zoulous d'Afrique du sud confectionnaient des flèches empoisonnées.

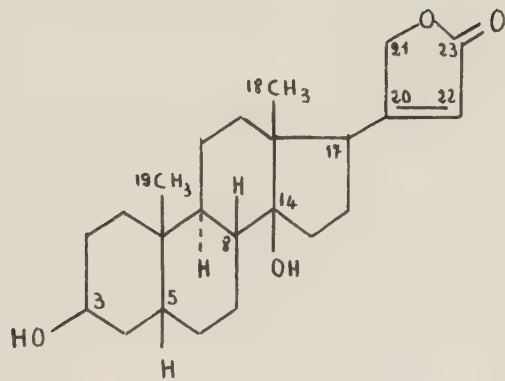
Depuis fort longtemps aussi les propriétés thérapeutiques de ces plantes ont été connues et utilisées en médecine. Ainsi *Scilla maritima*, une plante à bulbe de l'Europe du sud et de l'Afrique du nord était utilisée par les Egyptiens et les Romains comme expectorant, stimulant cardiaque et diurétique. Les Chinois confectionnaient dans le même but thérapeutique des préparations à base de sécrétions de la peau des crapauds (bufadiénolides). La "digitale", une préparation à base de tiges et de feuilles séchées de *Digitalis purpurea*, servait au traitement des hydropisies et en application externe.

Il est curieux de constater que les glycosides cardiotoniques ont d'abord été considérés comme diurétiques et ce n'est qu'en 1785 que les digitaliques ont été introduits en médecine cardiaque avec grand succès par le médecin écossais William WITHERING (2).

Sur le plan clinique, les premières investigations des principes actifs des digitaliques datent de la première partie du 19ième siècle (DESTOUCHES 1808,

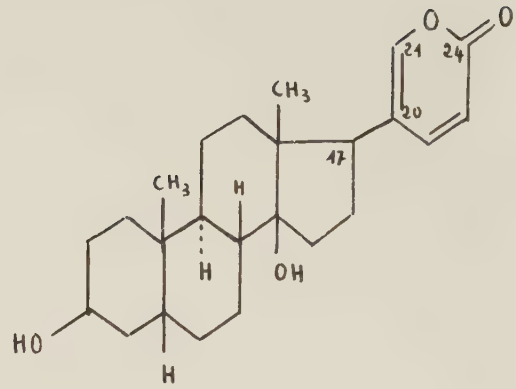
Figure 1

Cardénolide

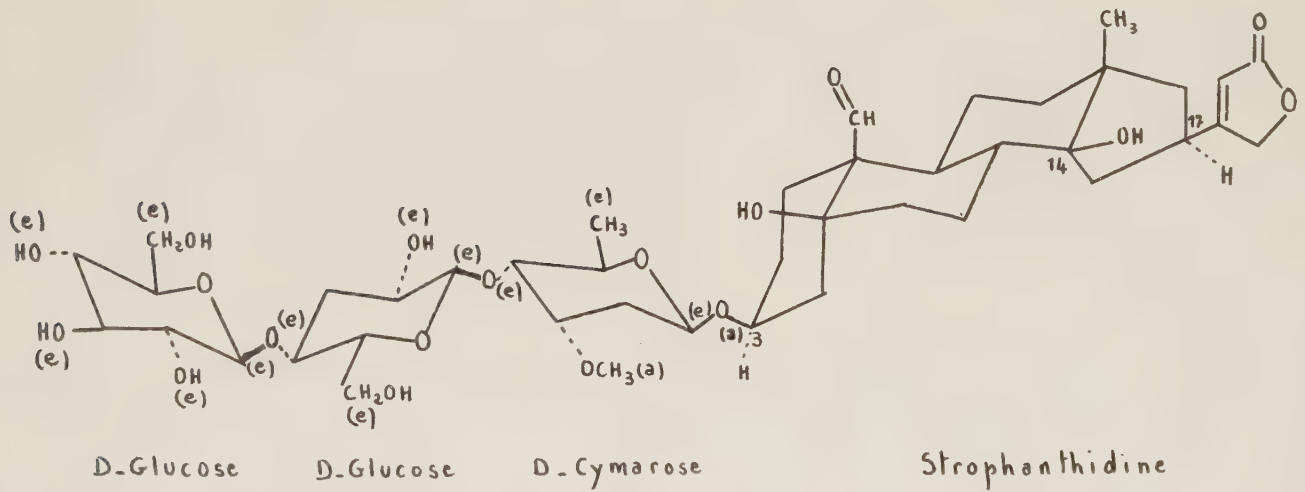


1 Digitoxigénine

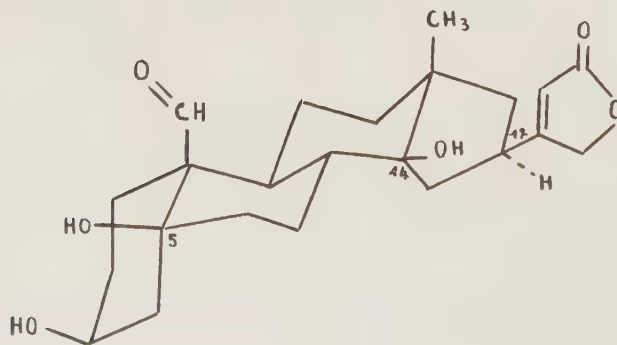
Bufadiénolide



2 Bufaline ou Scillarène A



3 K - Strophanthoside



4 Strophanthidine

HOMOLLE et QUEVENNE 1842). En 1869 NATIVELLE isola pour la première fois un glycoside à l'état cristallisé : la digitaline. Par la suite, des progrès considérables dans le domaine de l'isolement et de l'extraction des glycosides cardiotoniques ont été réalisés : grâce aux chimistes allemands : SCHMIEDEBERG, CLOETTA, KILIANI et KRAFT.

Les problèmes de structure ont été abordés dès 1915 par W.A. JACOBS et ses collaborateurs et plus récemment par A. STOLL et T. REICHSTEIN. A l'heure actuelle, si de nombreuses équipes continuent à extraire des produits naturels d'origine végétale ou animale, relativement très peu de travaux sont consacrés aux produits synthétiques non naturels.

1-1 LES HETEROSIDES CARDIOTONIQUES

Les glycosides cardiotoniques naturels comportent une partie osidique reliée à un alcool stérolique qui est appelé aglycone ou génine. Les aglycones ou génines sont de deux types : les cardénolides et les bufadiénolides.

Les cardénolides (1, Figure 1) les plus répandus chez les végétaux, sont des stéroïdes en C23 possédant une chaîne latérale en 17 de configuration β . Cette chaîne latérale est une lactone à cinq côtés, α β insaturée. En général, les cardénolides se distinguent des stérols par la présence en 14 d'un groupement hydroxyle de configuration β .

Les bufadiénolides (2, Figure 1) sont des stéroïdes en C 24 possédant en 17 un cycle lactonique à six côtés, doublement insaturé, de configuration β , et en 14 un groupement hydroxyle β . A la différence des cardénolides que l'on trouve uniquement dans le règne végétal, les bufadiénolides se rencontrent à la fois chez les animaux et chez les végétaux.

Les génines les plus simples et les plus représentatives de ces deux groupes sont la digitoxigénine (1) pour les cardénolides et la bufaline ou scillarène A (2) pour les bufadiénolides. Ces deux composés possèdent la structure minimum nécessaire et suffisante à l'activité cardiotonique, du moins dans l'état actuel de nos connaissances sur les relations structure-activité.

Contrairement aux cardénolides qui présentent un intérêt pratique en cardiothérapie, les bufadiénolides ont surtout un intérêt théorique et sont très peu utilisés à cause de leurs effets secondaires importants. C'est pourquoi dans la suite de notre travail, nous nous intéresserons uniquement aux cardénolides, caractérisés par la présence d'une lactone pentacyclique α β insaturée en position 17.

L'activité des glycosides cardiotoniques est liée essentiellement au squelette stérolique, c'est à dire à la génine. Le résidu sucre, relié à l'aglycone stérolique par une liaison osidique augmente, de façon souvent très marquée, l'activité due à la génine en améliorant sa solubilité, et en favorisant sa fixation sélective sur le myocarde (3).

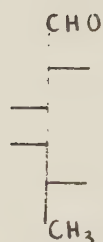
Figure 2 - Principaux oses constituant les hétérosides cardiotoniques naturels



D-Glucose



L-Rhamnose



D-Fucose



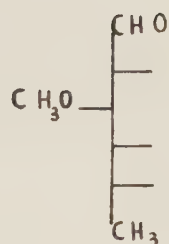
L-Talométhylase



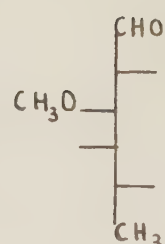
D-Gulométhylase



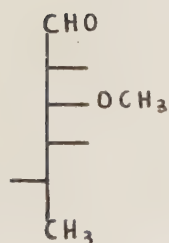
D-Allométhylase



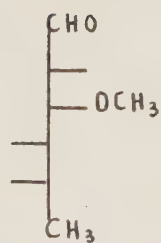
D-Thevetose



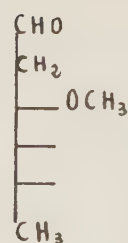
D-Digitalose



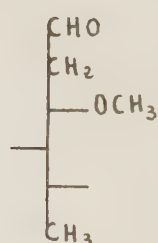
L-Acovenose



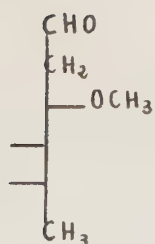
L-Acofriose



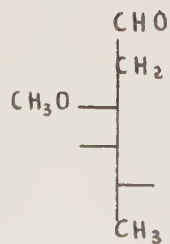
D-Cymarose



D-Sarmentose



L-Oleandrose



D-Diginose



D-Digitoxose



D-Boivinose

Pratiquement dans tous les glycosides connus, le sucre est présent sous forme pyranose (cycle fermé à 6 côtés) et la conformation préférentielle est la forme chaise. De plus, dans les glycosides naturels le résidu sucre est constitué par plusieurs oses reliés entre eux par des liaisons osidiques β (1-4), et relié lui-même à l'aglycone par une liaison osidique β , comme l'illustre bien la formule du k-strophanthoside (3, Figure 1).

Parmi les 16 aldohexoses isomères, seul le D-glucose est un constituant du résidu sucre des glycosides d'origine naturelle. Il figure généralement en combinaison avec d'autres sucres et il est rarement relié directement à l'aglycone (4). Les autres constituants sont des hexoses rares : sucres comportant un groupement méthyle en 6 comme le L-Rhamnose, le D-Fucose., 2-6 désoxysucres comme le D-Cymarose, le D-Sarmentose., la plupart de ces désoxysucres comportent un groupement méthylether OCH_3 en C_3 (Figure 2). Dans presque tous les glycosides naturels, l'enchainement peut être schématisé de la façon suivante :



La configuration des liaisons osidiques dans les glycosides est, selon KLYNE (5) telle que la rotation moléculaire de l'ensemble de la molécule de glycoside stérolique est approximativement égale à la somme des rotations moléculaires de l'alcool stérolique et des α ou β méthylsides constituant le résidu sucre.

De ces observations, KLYNE a tiré la règle suivante : tous les D-sucres sont reliés par des liaisons osidiques β alors que les L-sucres sont reliés par des liaisons osidiques de type α . Cependant quelques exceptions sont venues confirmer cette règle (6) (7) (2).

La nature de la liaison osidique peut également être déterminée par hydrolyse enzymatique sélective (8).

Les sucres obtenus par hydrolyse des cardénolides, sucres normaux, désoxy-sucres et dérivés carboxyliques ont d'abord été recensés par REICHSTEIN (9) puis par S. HANESSIAN (10) et plus récemment par SINGH et RASTOGI, pour les sucres rares nouveaux, isolés dans les années 1960 à 1967 (11).

Beaucoup de chercheurs et notamment K.K. CHEN se sont penchés sur le problème des relations structure-activité. De très nombreuses expériences ont

permis de tirer des conclusions parfois en contradiction les unes avec les autres.

Nous allons essayer de résumer brièvement les grandes lignes générales et les principales caractéristiques de ces relations structure-activité.

1-2 LES PRINCIPALES RELATIONS STRUCTURE - ACTIVITE

1-2-1 L'aglycone ou génine

Les aglycones les plus largement étudiés parmi les cardénolides sont la digitoxigénine (1, Figure 4) : dihydroxy - 3 , 14 , card -5 ,  nolide - 20 (22), extraite de la digitale et la strophanthidine (4, Figure 1) : trihydroxy -3 , 5 , 14 , oxocard - 19,  nolide - 20 (22), obtenue à partir de son glycoside, extrait des feuilles de Strophanthus Komb . Ces aglycones diff rent beaucoup par leur structure des autres classes de stéroïdes saturés et aussi des hormones de la série de l'androstane et du prégnane ou des oestrogènes.

Les génines des glycosides cardiotoniques ont généralement la structure suivante :

- cycles A et B : configuration cis
- cycles B et C : configuration trans
- cycles C et D : configuration cis

L'hydroxyle à en 3 a la position axiale, l'hydroxyle en 14 est à. Le plan moyen du cycle A fait avec le plan moyen des cycles B, C, et D, un angle assez prononcé, alors que, pour les autres stérols, la structure est pratiquement plane (Figure 3).

Les modifications de ce squelette ont une influence plus ou moins marquée sur l'activité cardiotonique.

Ainsi, une inversion de la configuration du substituant porté par le carbone 5, entrainant pour les cycles A et B la position trans, provoque une baisse considérable de l'activité : alors que la digitoxigénine (1) est très active, son homologue, l'uzarigénine (5) ne possède qu'une très faible activité. Cependant, l'introduction d'une double liaison en 4 n'entraîne pas de modifications notables. Par exemple, la Scillar nine (7) pour laquelle le groupement hydroxyle en 3 est pseudo axial, est presque aussi active que la P riplog nine (6) (Figure 4).

De même, les modifications de la structure spatiale des principaux groupements fonctionnels influent grandement sur l'activité biologique des cardénolides. Les cardénolides 17 α qui ont subi une inversion de configuration en 17 sont complètement dépourvus d'activité. Les épi-3 génines montrent une perte d'activité très prononcée, à la fois dans la série active des stéroïdes 5 β et dans celle moins active des stéroïdes 5 α , aussi bien que dans celle des stéroïdes 4 Δ (Figure 4).

La saturation du cycle lactonique par hydrogénation réduit beaucoup l'activité tonocardiaque.

L'activité cardiotonique est liée plus ou moins étroitement à la présence des groupements fonctionnels distribués sur le squelette stéroïdique. L'introduction d'un groupement aldéhyde en 19 augmente l'activité et celle d'un groupement hydroxy-méthyle dans la même position a le même effet.

L'introduction d'un groupement hydroxyle en position équatoriale augmente aussi l'activité dans les positions 5 β , 11 α , 12 β à l'exception de la position 7 β .

Par contre, dans la position 1 β , l'introduction d'un groupement hydroxyle équatorial diminue l'activité. La présence d'un groupement cétol en 11 et 12, d'un groupement époxy entre les carbones 1, et 11 diminue l'activité biologique (Figure 5) .

Dans l'ouabagénine, la création d'un pont isopropylidène entre les carbones 1 et 19 entraîne une perte totale d'activité. Notons aussi que lorsque l'introduction d'un groupement hydroxyle dans une position donnée diminue l'activité biologique, cet effet peut être compensé par acétylation.

1-2-2 La liaison osidique

Dans les plantes les aglycones sont le plus souvent conjugués par l'intermédiaire de leur groupement hydroxyle secondaire en 3 pour former

des glycosides.

La présence d'une ou de plusieurs molécules de sucre augmente l'activité mais d'une façon générale, moins un glycoside comporte de sucre, plus grande est son activité. C'est ainsi que les glycosides comportant une seule liaison osidique, c'est à dire les monosides, sont les plus actifs.

En ce qui concerne la stéréochimie de la liaison osidique, rappelons que celle-ci suit, à quelques exceptions près, la règle de KLYNE. L'oxygène relié au carbone 1 de l'ose est toujours équatorial par rapport au plan du cycle pyranose, ce qui semble correspondre à la configuration la plus stable thermodynamiquement. (exemple : le k-strophanthoside (3, Fig. 1)).

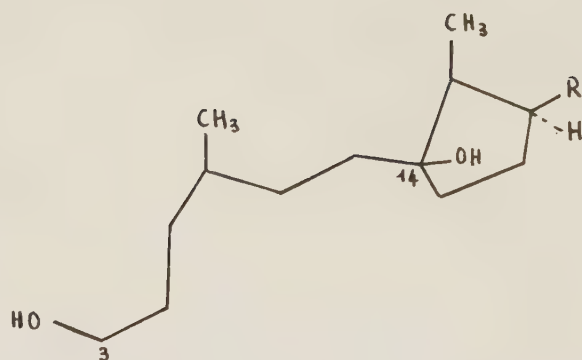
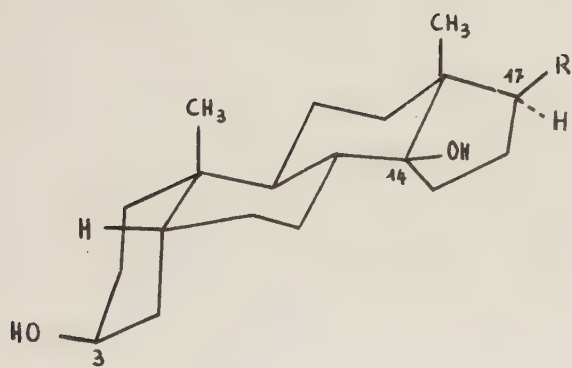
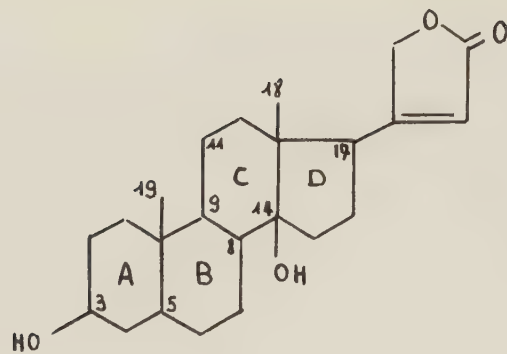
1-2-3 Le résidu sucre

Les relations existant entre la nature des sucres constituant la copule glucidique et l'efficacité biologique des cardénolides sont beaucoup moins nettement définies. D'une façon générale le D-glucose est toujours présent dans les glycosides les plus actifs. Les L-rhamnosides ont une activité moyenne et les D-cymarosides sont les moins actifs. Les sucres rares, dont la présence est caractéristique des glucosides cardiotoniques naturels : 2-désoxy sucres (absence de groupement OH en C₂), 5-méthyl pentoses (absence du groupement OH en C₆), 2-désoxy 5-méthyl pentoses, hydroxy-méthyl sucres en C₃ sont généralement moins favorables à l'activité biologique que le D-glucose (Figure 2).

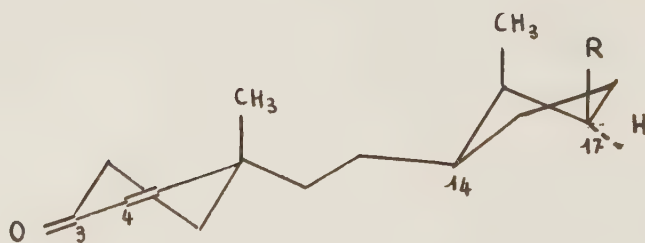
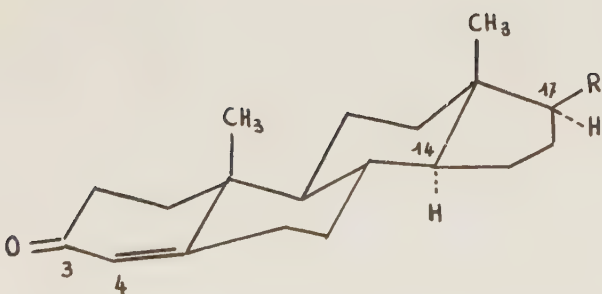
Grâce à la synthèse de nouveaux cardénolides non naturels comportant des sucres inhabituels chez les glycosides cardiaques, certains auteurs (12) ont émis l'hypothèse qu'il pouvait exister une relation entre le degré d'hydroxylation du résidu pyranose d'un cardénolide et son efficacité biologique. Il semble que l'activité cardiotonique diminue avec le nombre des groupements hydroxyles sur le cycle pyranose. Ces hypothèses ont été émises à la suite des travaux de CHEN et de ses collaborateurs (13 - 14).

De toutes ces observations et réflexions dégagées à la suite d'un travail considérable réalisé par de nombreuses équipes de chercheurs et notamment

Figure 3

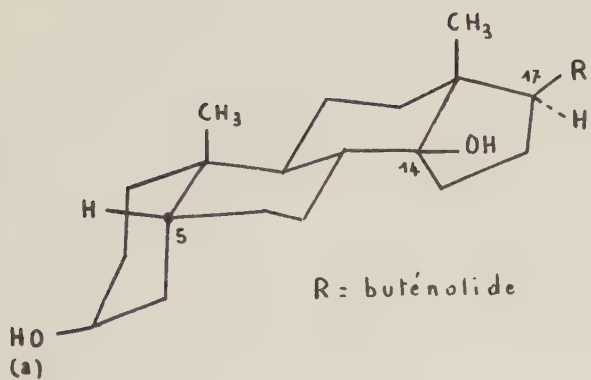


Aglycone cardiotonique type

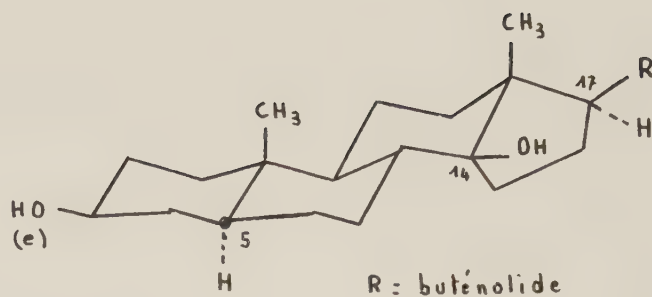


Hormones de la série de l'androstane et du prégnane

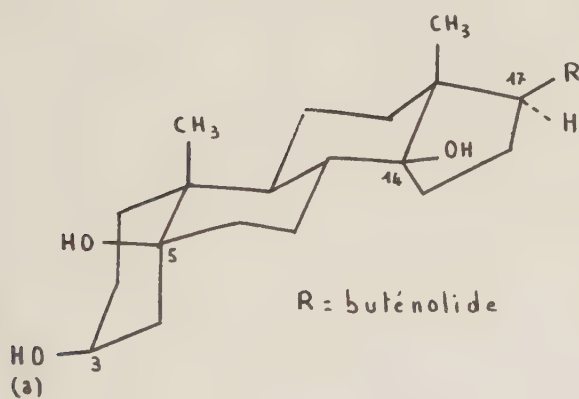
Figure 4



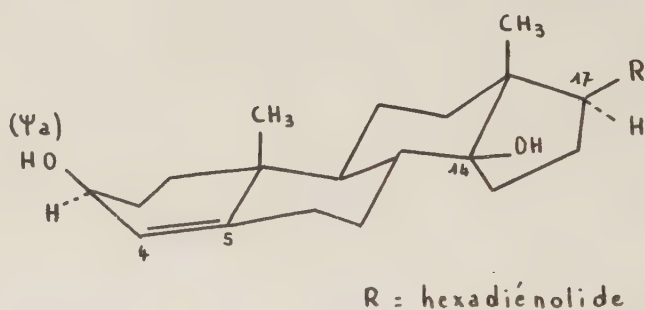
1 Digitoxigénine



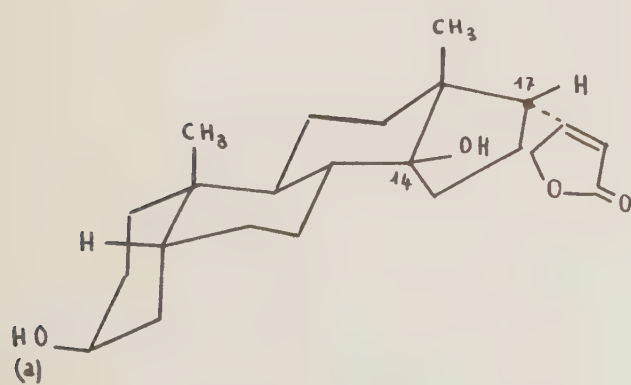
5 Uzarigénine



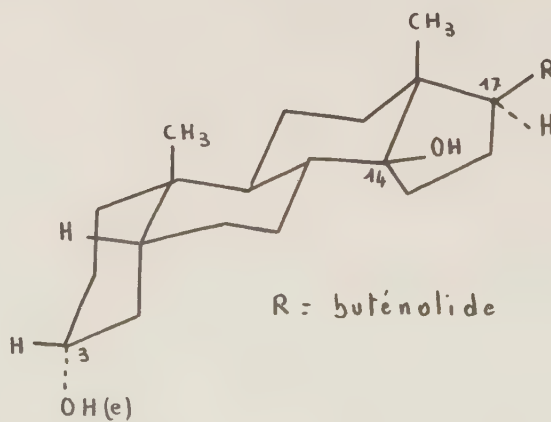
6 Périplogénine



7 Scillarénine

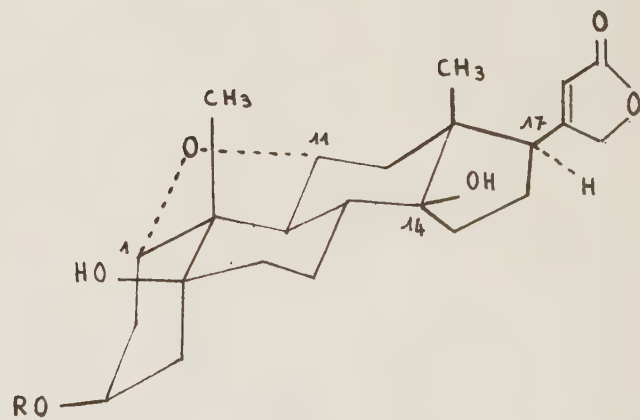
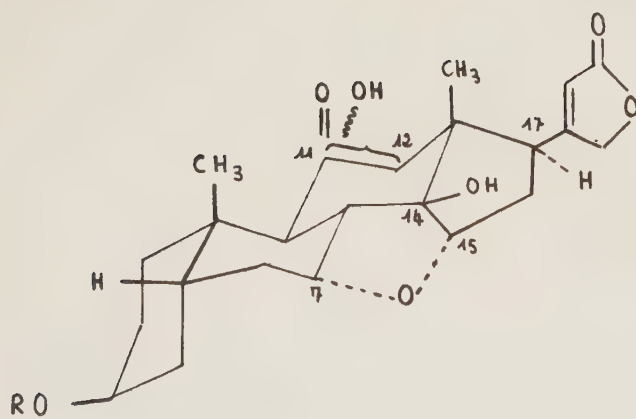
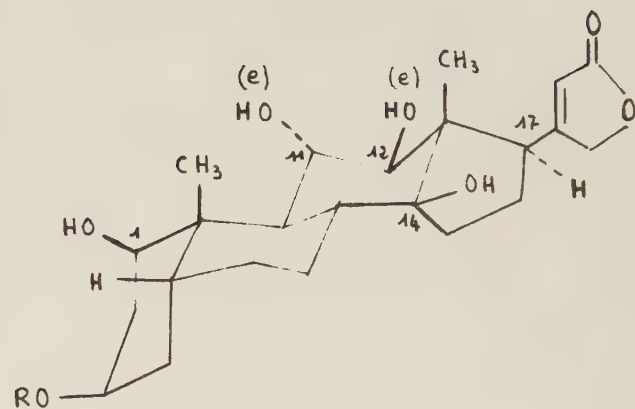
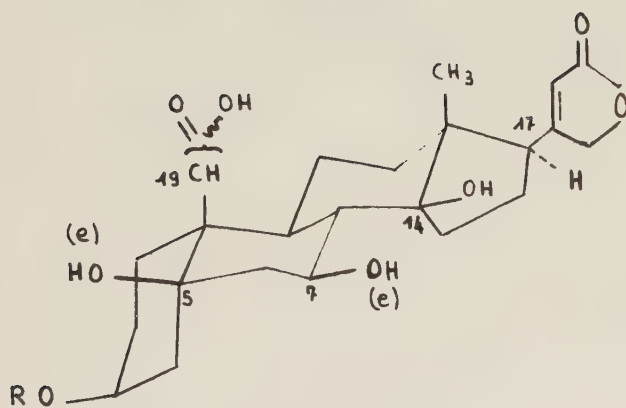


17α Cardénolide



8 3 Epidigitoxigénine

Figure 5



celles de CH. TAMN et K.K. CHEN, nous pouvons tirer brièvement les conclusions suivantes :

- Tout d'abord, la présence en 17 d'un cycle buténolide (lactone pentacyclique α β insaturée), de configuration β semble indispensable à l'efficacité biologique des glycosides cardiotoniques.

- D'autre part, une copule glucidique en 3, le D-glucose étant le sucre le plus favorable, joue un grand rôle en favorisant la solubilité, l'absorption et la distribution des drogues ainsi que leur affinité sélective pour le tissu cardiaque.

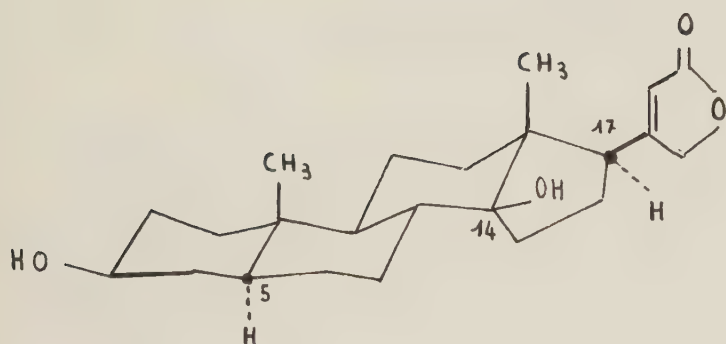
- Enfin, la liaison osidique elle-même, participe pour une grande part à l'activité cardiotonique.

1-3 LES PRINCIPAUX CARDENOLIDES NATURELS CONNUS

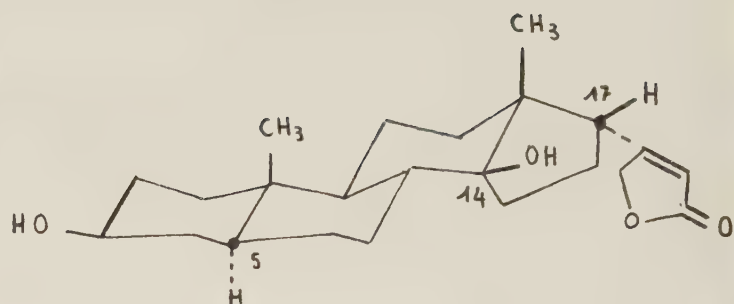
En 1775, William WITHERING, éminent médecin et botaniste anglais a découvert les vertus thérapeutiques des feuilles de digitale, *Digitalis purpurea*. Depuis cette époque, plusieurs centaines d'hétérosides cardiotoniques ont été isolés des plantes grâce aux travaux des chimistes allemands au XIXe siècle puis des chimistes américains de l'Institut Rockefeller à New York. A l'heure actuelle, de nombreuses équipes dans le monde entier travaillent pour isoler et déterminer la structure de nouveaux glycosides cardiotoniques. Dans une mise au point récente BHAGIRATH SINGH et R.P. RASTOGI (11) ont recensé tous les cardénolides naturels connus, dont la structure a été soit partiellement, soit totalement élucidée. Dans les années 1960 à 1967, 47 nouveaux aglycones ont été isolés et leur structure entièrement déterminée.

Pendant longtemps, la détection et l'isolement des cardénolides a été difficile à cause de leur instabilité vis à vis des acides et des bases, et de leur labilité vis à vis des enzymes hydrolytiques. Les progrès des techniques chromatographiques et particulièrement de la chromatographie en couche mince (15) ont été très précieux pour la chimie des cardénolides. A côté de la spectrographie Ultra-Violette et Infra-Rouge, la Résonance Magnétique Nucléaire et la spectrographie de masse sont de plus en plus utilisées pour déterminer la structure des aglycones, la nature des sucres et leur enchainement.

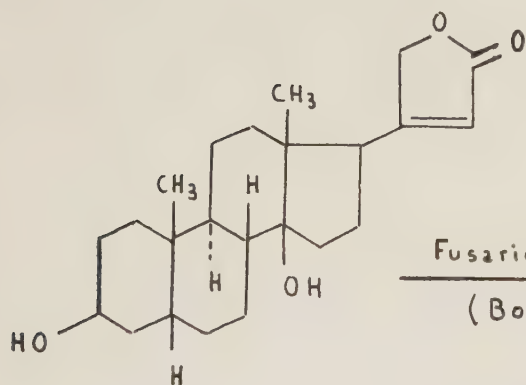
Figure 6



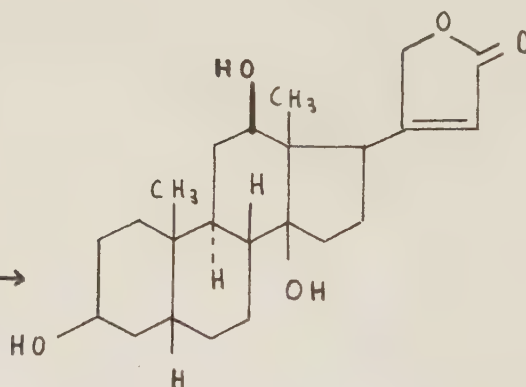
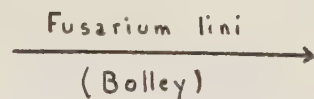
5 Uzarigénine



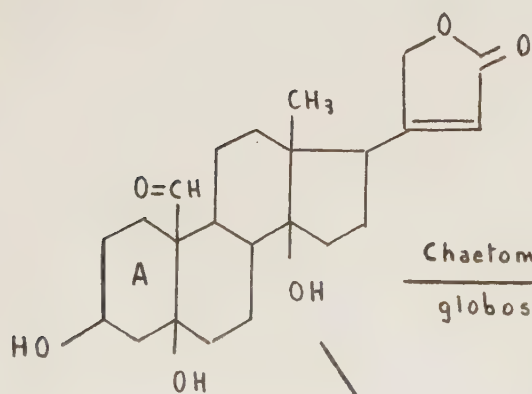
9 Allo uzarigénine



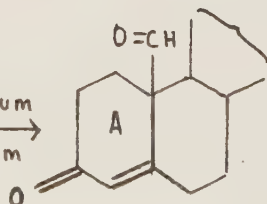
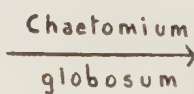
1 Digitoxigénine



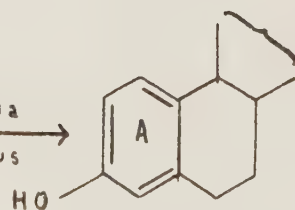
10 Digoxigénine



4 Strophanthidine



11 Anhydrostrophanthidone



12



1-4 SYNTHESE DE CARDENOLIDES NATURELS

1-4-1 Synthèse totale

La synthèse, dans le domaine stérolique n'a pris un véritable essor que depuis les deux dernières décades. Antérieurement, les travaux de RUZICKA, PLATTNER et ELDERFIELD ont contribué au développement des méthodes de synthèse permettant de construire le groupement buténolide en 17 d'une part et d'introduire un groupement OH β en 14 dans les stéroïdes en c_{20} d'autre part.

Ces recherches ont conduit à la synthèse de l'allo uzarigénine (9, Fig. 6), composé biologiquement inactif différent de l'uzarigénine (5), uniquement par l'orientation du cycle buténolide en 17. Dans l'allo uzarigénine (9), le cycle buténolide en 17 est α , alors qu'il est β dans l'uzarigénine (5). (16). Cette synthèse a été réalisée à partir de : diacétoxy- 3 β , 21, oxy-14, céto-20, iso-17 diallo-5, 14 prégnane.

Ce n'est qu'en 1962 que SONDHEIMER et son équipe ont réalisé la première synthèse totale d'une génine cardiotonique, la digitoxigénine (1) à partir d'acétoxy- 3 β , hydroxy-14 β , étionate-5 β (17). Par la suite une méthode générale de synthèse de nouvelles génines, utilisant des dérivés du furfural comme point de départ a été mise au point (18). Un certain nombre de furylandrostanes et oestrane ont été convertis en buténolides stéroliques correspondants.

1-4-2 Synthèse partielle : glycosylation de génines naturelles.

Il est bien établi maintenant que le ou les oses constituant la copule glucidique des cardénolides ainsi que la liaison osidique reliant l'aglycone au résidu sucre contribuent pour une part importante à l'activité cardiotonique. Les nombreux auteurs qui se sont penchés sur le problème de la synthèse partielle des cardénolides ont poursuivi un triple but :

- Tout d'abord confirmer la structure de cardénolides naturels isolés des plantes.

- Etudier les relations structure-activité en faisant varier le résidu sucre fixé sur un même aglycone.

- Trouver des cardénolides nouveaux, soit plus actifs que les cardénolides naturels soit à action plus rapide et à durée de vie plus longue.

Les premiers cardénolides hémisynthétiques ont été réalisés par UHLE et ELDERFIELD dès 1943 (19). Ces auteurs ont couplé quatre O-tétracétyl-bromo-ose (D-xylose, L-arabinose, D-glucose et D-galactose) avec la strophanthidine (4) réalisant ainsi les quatre premiers monosides de synthèse. A cette époque, aucun cardénolide de la strophanthidine connu, ne comportait ces oses reliés directement à l'aglycone.

De plus la glucosyl-strophanthidine s'est avérée très active, beaucoup plus active que les autres hexosides naturels connus. Parmi les très nombreux travaux réalisés, citons la synthèse partielle de la convallotoxine ou O-(6- désoxy α - L-mannopyranosyl) 3β - strophanthidine, cardénolide naturel, de REICHSTEIN (20).

La convallotoxine est considérée comme le plus puissant de tous les cardénolides naturels connus.

La liste des cardénolides synthétiques nouveaux s'est allongée très rapidement.

En 1966, ZORBACH et BHAT recensaient déjà une cinquantaine d'osides synthétiques (21).

1 - 4 - 3 Transformations microbiologiques

L'étude des transformations microbiologiques des cardénolides n'a débuté qu'en 1958 avec les travaux de GUBLER et TAMM. A la suite des résultats obtenus en série stérolique, notamment avec la testostérone et la progestérone, ces auteurs ont examiné l'action de *Fusarium lini* (Bolley) sur la digitoxigénine (1) (Fig. 6). Ce microorganisme réalise une hydrosylation β sélective en position 12 de la digitoxigénine (1), produisant ainsi la digoxigénine (10) avec un rendement de 40 % (22).

D'autres microorganismes ont, par la suite, été utilisés pour réaliser différents types de réactions : déshydrogénation , hydrolyse, oxydation. Ces méthodes de synthèse partielle présentent le très gros avantage d'être sélectives, chaque microorganisme n'attaquant qu'une position bien déterminée qui lui est propre.

Ainsi, l'incubation de la strophanthidine (4) avec *Chaetomium globosum* conduit à l'anhydro strophanthidone (11), alors que l'incubation avec *Nocardia restrictus* conduit à un analogue de la strophanthidine dans lequel le cycle A est totalement aromatisé (12, Figure 6) (23).

Bien que très précieuses pour l'étude des génines cardiotoniques et leur détermination de structure, ces méthodes microbiologiques ne sauraient être encore, à l'heure actuelle, considérées comme des méthodes de synthèse efficaces.

1-5 SYNTHÈSE D'ANALOGUES NON NATURELS DES CARDENOLIDES

Si, dans le domaine des cardénolides, un travail considérable a été réalisé en ce qui concerne l'isolement et la détermination de structure des produits naturels, l'étude des relations structure-activité, l'étude du métabolisme et surtout l'étude des mécanismes d'action possibles au niveau du myocarde aussi bien in vivo qu'in vitro, par contre en ce qui concerne la synthèse, les travaux réalisés peuvent se classer en trois catégories :

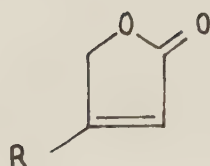
- quelques essais limités de synthèse totale
- de nombreuses synthèses partielles de monosides : glycosylation de génines naturelles
- des modifications partielles chimiques ou microbiologiques de génines naturelles

Les premières synthèses d'analogues de cardénolides sont dues à ELDERFIELD et son équipe dès 1941. Ces auteurs, ont eu les premiers, l'idée de remplacer le squelette stérolique fixé sur le carbone du cycle buténolide des cardénolides par un radical plus simple, soit un hydrocarbure aromatique : benzène (24 à 28), naphtalène (25 - 29), soit un hydrocarbure cyclanique : cyclohexane principalement (24 - 29 - 30). Tous ces travaux ont eu le grand mérite de mettre au point puis d'améliorer les méthodes de synthèse du cycle buténolide α β insaturé. Cependant, les divers analogues ainsi synthétisés n'ont pas présenté d'activité cardiotonique satisfaisante (Fig. 7).

En effet, si tous les dérivés obtenus comportaient bien un cycle lactonique α β insaturé, indispensable à l'activité cardiotonique, par contre les squelettes de base introduits étaient très éloignés, par leur dimension moléculaire, des squelettes stéroliques naturels, et de plus, tous ces dérivés ne possédaient pas de résidu.sucre ni de liaison osidique dont nous avons vu l'importance pour l'activité.

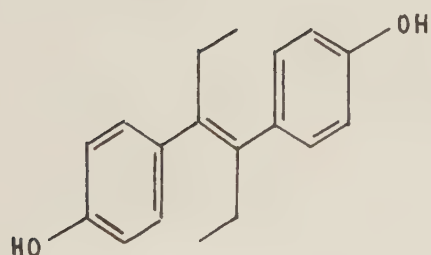
Quelques années plus tard, après la découverte d'oestrogènes synthétiques puissants tels le stilboestrol et l'hexoestrol (13 et 14) ; CAMPBELL et HUNT (31) préparèrent des analogues de ces deux oestrogènes dans lesquels ils

Figure 7

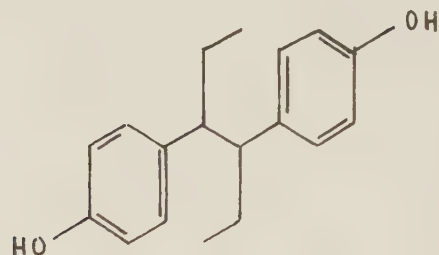


R = benzyl
naphthyl
cyclohexyl

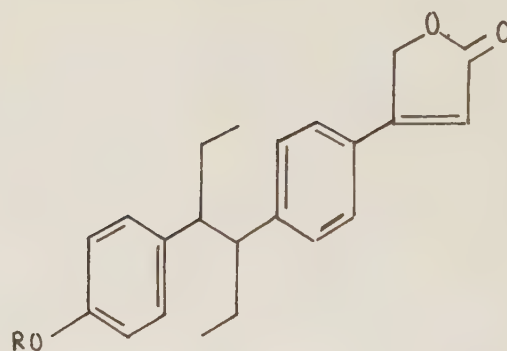
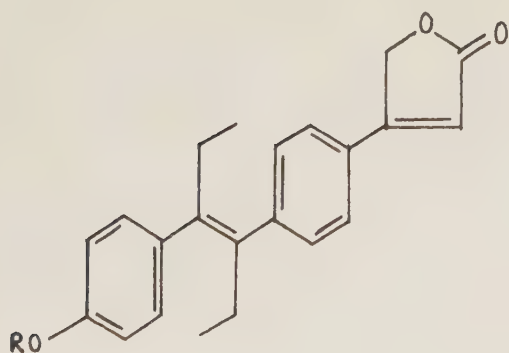
Analogues de cardénolides synthétisés par ELDERFIELD



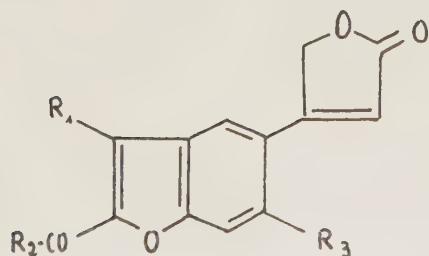
13 Stilboestrol



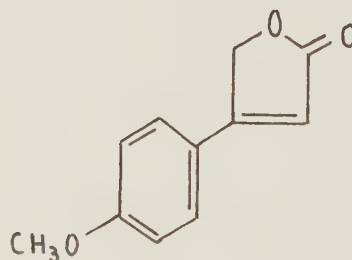
14 Hexoestrol



Analogues de cardénolides synthétisés par CAMPBELL et HUNT



Benzofurannes à cycle buténolide



15 Eudilat

remplacèrent un des groupements phénoliques par le cycle buténolide, afin d'obtenir des dérivés ressemblant, d'allure générale à la digitoxigénine. Bien que l'analogie structurale avec la génine des cardénolides soit considérablement améliorée tous ces dérivés ne comportaient pas de résidu sucre ni de liaison osidique et de ce fait, leur activité cardiotonique fut assez décevante.

Par la suite, la littérature ne signale plus d'autres tentatives de synthèse d'analogues des cardénolides jusqu'en 1966 où sont publiés les travaux de SCHMITT et son équipe (32). S'inspirant des modèles naturels, et reprenant les travaux antérieurs d'ELDERFIELD, ces auteurs ont préparé des structures plus simples en conservant l'anneau lactonique de la molécule et en associant un substituant en β de la fonction cétone du buténolide à l'image des aglycones d'hétérosides. C'est ainsi qu'ont été synthétisés des dérivés du benzofuranne, portant un radical buténolide. Ces produits qui présentent des propriétés vasodilatatrices, coronarodilatatrices, cardiotoniques et hypotensives font l'objet d'un brevet spécial de médicaments (33). Parmi les méthoxy-phényl buténolides synthétisés par SCHMITT et ses collaborateurs (32), citons le (méthoxy-4 phényl) - 4 oxo-2 dihydro-2,5 furanne (15, Fig. 7) introduit en thérapeutique sous le nom d'Eudilat en raison de ses propriétés vasodilatatrices. Cette substance exerce in vitro sur l'oreillette de cobaye isolée une activité cardiotonique égale à 20 % de celle de l'ouabaine, mais elle est surtout utilisée en tant que vasodilatatrice.

En ce qui concerne l'activité cardiotonique proprement dite SCHMITT (35) signale que les différentes substances testées sur l'oreillette isolée du cobaye présentent une activité relative intéressante et un indice thérapeutique favorable mais qu'elles ont donné des résultats cliniques insuffisants.

A notre connaissance, parmi tous les analogues de cardénolides synthétisés jusqu'à présent, aucun ne comporte de résidu sucre et par conséquent de liaison osidique. Or toutes les études biochimiques et les études des relations structure-activité ont montré le rôle important de la copule glucidique et de la liaison osidique pour l'activité cardiotonique.

Figure 8

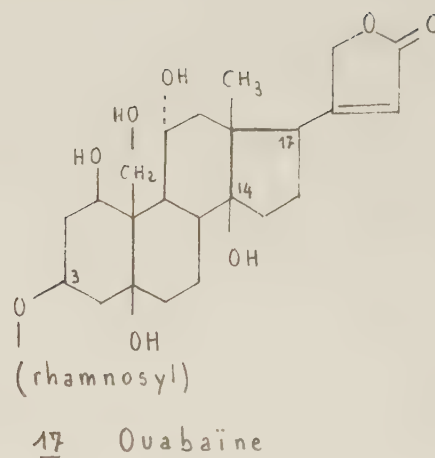
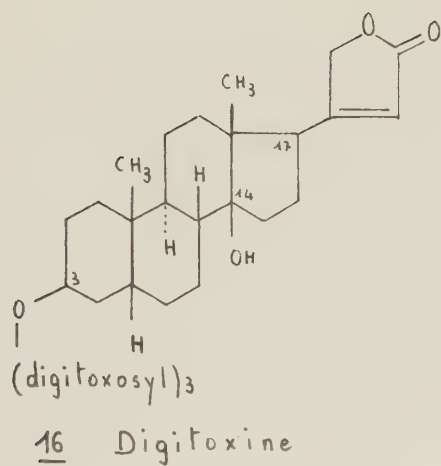
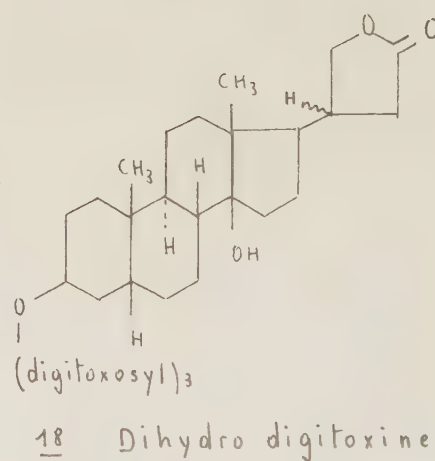
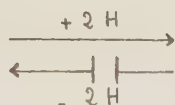
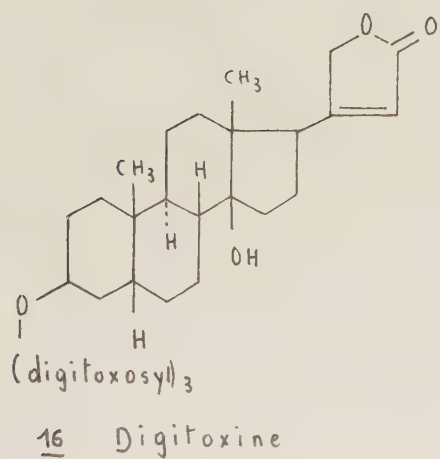
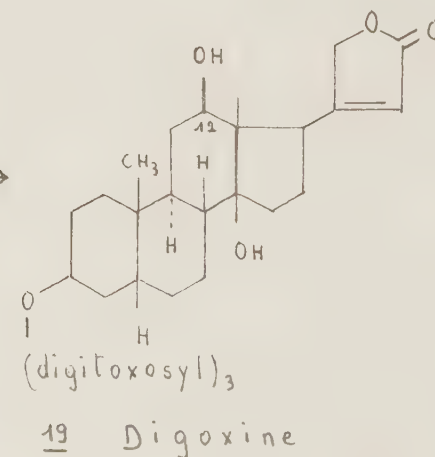
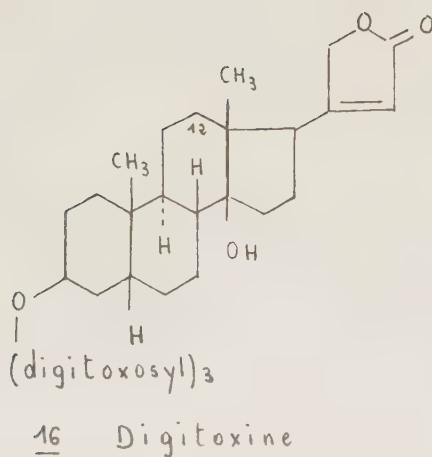


Figure 9



Absence de réaction Rédox dans le cycle lactonique

Figure 10



Hydroxylation en position 12 β

Il était donc permis de penser que la synthèse d'analogues simplifiés des cardénolides naturels, comportant un cycle buténolide et de plus, un résidu sucre relié à l'aglycone par une liaison osidique, présenterait un grand intérêt.

1-6 METABOLISME DES GLYCOSIDES CARDIAQUES

MECANISME D'ACTION BIOCHIMIQUE.

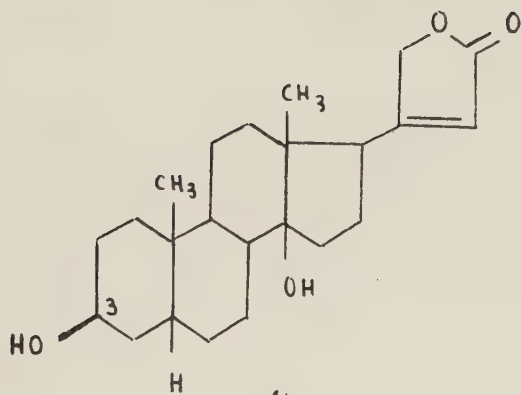
Les effets thérapeutiques cardiaques des digitaliques sont connus depuis longtemps et ont été récemment résumés par BOUYARD et KLEIN (35) dans la règle mnémotechnique des 3 R : ils renforcent, régularisent et ralentissent le coeur. En termes plus scientifiques, les hétérosides digitaliques ont :

- une action inotrope positive, c'est à dire qu'ils augmentent la force contractile systolique du coeur normal ou déficient.
- une action chronotrope négative, c'est à dire qu'ils ralentissent le coeur (action bradycardisante). Ce dernier phénomène, le plus important est dû à différents facteurs agissant conjointement et de façon complexe à la fois au niveau de la fibre cardiaque et du système vagal.

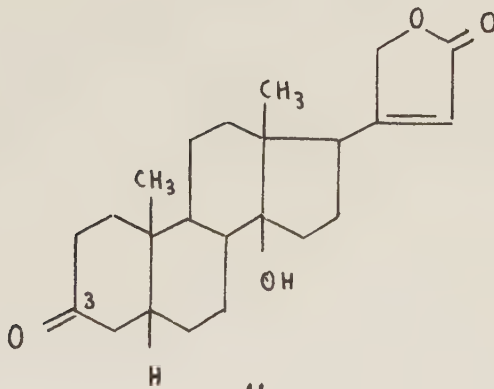
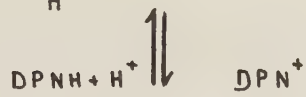
Bien que les cardénolides agissent de façon spécifique sur le coeur, ils présentent cependant un certain nombre d'actions secondaires dont la plus importante est l'action diurétique. Cette action sur le rein a été connue depuis fort longtemps par les Grecs et les Arabes et couramment constatée par la suite chez les malades traités par les digitaliques. Ce n'est qu'en 1956, que les travaux d'HYMAN (36) puis de ORLOFF et BURG (37) ont prouvé de façon évidente leur rôle dans l'excrétion de l'eau et du sodium. Ils ont d'autre part un pouvoir émétique variant avec les espèces et les individus et entraînent une perte d'appétit notable. Quelques uns sont convulsivants.

Enfin, il y a de grandes variations individuelles en ce qui concerne le mode d'action des cardénolides. Il est bien connu que la digitoxine (16, Fig. 8) agit après un long temps de latence mais de façon prolongée alors que l'ouabaïne (17, Fig. 8) agit rapidement pendant un temps assez court. Ainsi, pour l'utilisation, éventuelle d'un cardénolide en clinique, l'efficacité biologique, n'est pas le seul facteur à considérer. La rapidité et la durée d'action sont de toute première importance à côté de la toxicité. Les cardénolides les plus dignes d'intérêt sont ceux qui sont actifs, peu

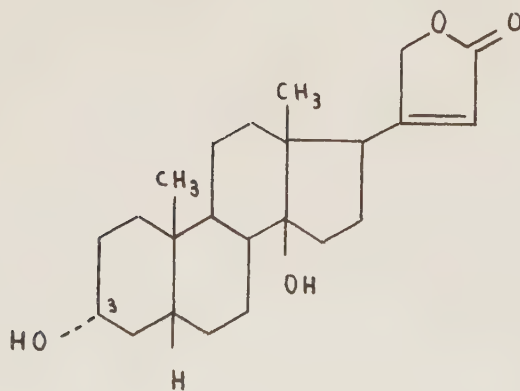
Figure 11



GENINE (avec OH en 3 β)



3- DEHYDRO-GENINE



3- EPI-GENINE (avec OH en 3 α)

Epimérisation en position 3

toxiques et qui agissent très rapidement, sans accumulation. Le phénomène d'accumulation est en effet un des inconvénients majeurs de la plupart des cardénolides naturels.

1-6-1 Biotransformation et mécanismes d'action éventuels des cardénolides.

Le travail dans le domaine du métabolisme des cardiotoniques stéroïques est presque exclusivement limité aux composés du type digitale et strophanthus (38).

Nous avons vu précédemment que les glycosides cardiaques agissent après un temps de latence (même dans le cas d'injections intraveineuses) allant de quelques minutes, à plusieurs heures, selon le glycoside et la dose utilisée (39 à 43). Compte tenu de ces observations, de nombreux auteurs ont été amenés à chercher si c'est bien le glycoside qui agit sur le coeur ou si, éventuellement, des produits de sa biotransformation peuvent interférer avec le métabolisme intermédiaire du tissu cardiaque (44 à 47).

1-6-1-1 Réactions d'oxydo-réduction dans le cycle lactonique.

Les travaux de STRAUB (48) KILIANI (49) WINDAUS (50) CLOETTA (51) JACOBS (52) et ELDERFIELD (53) ont montré que le cycle lactonique est de première importance pour l'efficacité biologique des cardénolides. SEGRE (54) a émis l'hypothèse que ce cycle lactonique α β insaturé des cardénolides pourrait fonctionner, comme transporteur d'hydrogène, un peu à la manière des nucléotides pyridiniques, interférant ainsi avec le métabolisme intermédiaire. En fait, après injection de digitoxine (16) chez l'animal, de la dihydro digitoxine (18, Fig. 9) en très faible dose a pu être mise en évidence dans le foie (38) mais, la réversibilité de cette réaction n'a jamais pu être démontrée. Cette hypothèse a donc été abandonnée assez rapidement (55).

1-6-1-2 Hydroxylation du squelette stérolique en C₁₂

Comme nous l'avons vu précédemment l'efficacité biologique des cardénolides dépend en partie du nombre et de la nature des fonctions oxygénées distribuées sur le noyau stérolique. De nombreuses expériences ont montré que, pour la majeure partie des cardénolides, le métabolisme passe par l'intermédiaire d'une hydroxylation du noyau stérolique dans des positions variables, le cycle lactonique restant inaltéré. L'hydroxylation en 12 β de la digitoxine (16), de la digitoxigénine digitoxoside, de la gitoxigénine digitoxoside, de la xysmalagénine... a été observée chez beaucoup d'animaux mais pas chez le cobaye, animal très sensible aux digitaliques (Figure 10) (56 à 61). Il apparaît maintenant que le rôle pharmacodynamique de cette hydroxylation est de convertir les composés lipo-solubles en dérivés plus polaires pouvant être plus facilement excrétés sous forme de glucuronides (62).

1-6-1-3 Epimérisation en C₃

Le groupement hydroxyle en C₃ s'est avéré être un centre important de transformations enzymatiques des aglycones. En position β dans presque tous les produits naturels, il subit chez l'animal une inversion de configuration en position α , ces deux réactions étant rapides et réversibles dans des conditions appropriées (Figure 11).

L'hypothèse que les génines pourraient fonctionner en tant que transporteurs d'hydrogène en jouant le rôle de coenzymes des transhydrogénases a été émise puis rapidement abandonnée (63). En effet, les enzymes d'épimérisation abondantes dans le foie n'ont pu être que difficilement décelées, sous forme de traces, dans le muscle cardiaque. Il apparaît clairement maintenant que l'épimérisation des cardénolides chez les êtres vivants est en fait un processus de détoxification : l'activité biologique des 3-déhydro dérivés des génines est considérablement réduite (49-64) et celle des 3-épi dérivés est pratiquement nulle (64 - 65). Ceci est en

accord avec le fait, couramment observé, que les génines ont une activité tonicardiaque, relativement forte, mais très fugace, étant rapidement inactivées par épimérisation.

1-6-1-4 Hydrolyse de la copule glucidique.

A côté du cycle lactonique et du noyau stérolique, le résidu sucre joue aussi un grand rôle en ce qui concerne les propriétés pharmacodynamiques des cardénolides. Les enzymes de l'organisme aussi bien humain qu'animal, sont capables d'hydrolyser la copule glucidique des cardénolides en libérant le sucre et la génine, cependant la scission des glycosides, est beaucoup plus lente que la biotransformation des génines (66 - 55 - 67 - 68). Notons aussi que l'hydrolyse des résidus sucre et principalement du glucose est due pour une grande part aux bactéries cellulolytiques du tractus intestinal. En étudiant la durée de vie de la digitoxigénine (1) (aglycone) comparative-ment à celle de la digitoxine (16) (glycoside) chez le rat, K. REPKE (69) a montré que la copule glucidique bloque de façon très efficace la dégradation du glycoside en dérivés inactifs, les réactions de détoxification ne survenant qu'après hydrolyse totale du glycoside (70).

Ainsi, le rôle pharmacodynamique du résidu sucre des cardénolides est de soustraire le groupement hydroxyle en C₃, à l'attaque enzymatique, la molécule étant ainsi protégée d'une inactivation rapide par épimérisation (55 - 67 - 68 - 69).

Cependant, depuis les travaux de H.J. PORTIUS et K. REPKE (38) en 1963, on sait maintenant que ce n'est pas dans le métabolisme et la biotransformation des cardénolides qu'il faut chercher une explication de leur mécanisme d'action, particulièrement de leur sélectivité et de leur action inotrope. Il est bien établi maintenant que ces biotransformations, survenant pour la plupart dans le foie, sont des processus de détoxification.

Cependant, ces processus de détoxification présentent un grand intérêt. En effet, il ne sert à rien de disposer d'un produit très actif, s'il ne peut être éliminé par l'organisme et constitue un véritable poison.

A l'opposé, un produit possédant une activité intrinsèque mais rapidement inactivé et dégradé par l'organisme n'aurait pas plus d'utilité.

1-6-2 Mécanisme d'action et action inotrope

Pendant longtemps, le principal problème concernant le mécanisme d'action des cardénolides a été de savoir quels étaient la nature et le rôle de leurs récepteurs. Dès 1961 L. REPKE (38), tenant compte du fait que les glycosides cardiaques sont actifs à des doses infinitésimales, supposa que leurs récepteurs étaient de nature enzymatique : enzymes distinctes ou systèmes enzymatiques complexes. A cette même époque, certains auteurs, cherchant à expliquer l'action des cardénolides sur le transport actif des ions, émirent l'hypothèse que ces récepteurs pourraient bien être les adénosines triphosphatases ou ATPases de membrane fonctionnant comme des pompes à cations (71 - 72). A l'heure actuelle, c'est cette dernière hypothèse qui est retenue, après de nombreuses vérifications et confirmations.

1-6-2-1- Action des cardénolides sur le métabolisme cardiaque.

De nombreuses expériences, réalisées pour la plupart in vitro sur des coeurs isolés ou des coupes de muscle cardiaque ont montré que les cardénolides modifient quelque peu le métabolisme cardiaque. De ce fait certains auteurs, ont été amenés à penser que ces interférences avec le métabolisme cardiaque intermédiaire pourraient être à l'origine, tout au moins en partie, de l'action inotrope positive des cardénolides. Ainsi, il a été montré sur des coupes de tissu que les glycosides cardiaques stimulaient la respiration du myocarde (73 - 74). Mais cette augmentation de la consommation d'oxygène observée in vitro ne se retrouve pas dans le coeur

humain, in situ. FURCHGOTT (75) et plus tard LEE (76) ont relié ce phénomène avec une modification des phosphates, riches en énergie et WOLLENBERGER (77) a pu conclure que l'action inotrope positive des cardénolides était sans rapport avec l'augmentation de la consommation d'oxygène du myocarde. De même KIEN et SHERROD, utilisant du glucose marqué au C^{14} montrèrent que les cardénolides augmentaient la consommation de glucose, du coeur in situ chez le chien (78), puis des expériences complémentaires prouvèrent que cette augmentation du métabolisme du glucose était en fait due à une plus grande facilité d'entrée du glucose dans les cellules du myocarde (79). En ce qui concerne donc les interférences des cardénolides avec le métabolisme cardiaque, beaucoup d'expériences contradictoires ont été réalisées et de ces expériences un grand nombre de conclusions divergentes ont été tirées. Ceci peut s'expliquer par l'utilisation d'un matériel d'étude très différent suivant les auteurs et de préparations souvent très artificielles dans des conditions plus ou moins éloignées des conditions physiologiques normales.

1-6-2-2 Action des cardénolides sur le transport ionique.

Depuis assez longtemps déjà, l'interaction des cardénolides avec le mouvement des ions dans le myocarde a été soupçonnée. En effet, dès 1931, CALHOUN et HARRISON (80) remarquèrent que, après autopsie, le coeur des malades traités aux digitaliques contenait moins de potassium que celui des malades n'ayant pas été soumis à ce traitement. Pour étudier de plus près ces phénomènes au niveau de la cellule, il s'est avéré par la suite nécessaire de trouver un modèle se rapprochant le plus possible par ses propriétés du tissu contractile cardiaque et le modèle le plus utilisé a été l'érythrocyte humain ou RBC. Les premières expériences de GLYNN (81) et de SOLOMON (82) sur les RBC permirent de supposer que les glycosides cardiaques entraient en compétition avec ce cation vis à vis d'une entité biochimique, responsable normalement du transport ionique contre un gradient de concentration. Quelques années plus tard POST et ses collaborateurs (83) DUNHAM et GLYNN (84) montrèrent que les RBC contiennent une ATPase nécessitant à la fois K et Na pour son activité maximum. Ces auteurs trouvèrent que les cardénolides inhibent

cette enzyme à des concentrations comparables à celles qui inhibent le transfert des cations et que cette inhibition décroît lorsque la concentration en potassium du milieu est augmentée. A la suite des travaux de HADJU et de ses collaborateurs (85) beaucoup d'auteurs ont vu une relation de cause à effet entre la perte de potassium du myocarde et les effets inotropes positifs des cardénolides. Quoique séduisante par sa simplicité, cette hypothèse s'est avérée rapidement être en contradiction avec d'autres expériences et a dû être abandonnée. Il est apparu clairement par la suite que cette perte de K est en relation avec les effets toxiques des cardénolides.

L'importance du calcium pour la contraction du coeur a été notée dès 1883 par RINGER (86) puis largement étudiée par A.J. CLARK en 1912 (87). Plus récemment les travaux de SHANES (88) et CSAPO (89) amenèrent à penser que le calcium devait être au centre du mécanisme de la contraction cardiaque servant de lien entre l'excitation et la contraction. En 1948, WILBRANDT et KOLLER (90) puis NIEDERGERKE (91-92) en 1956, travaillant sur le coeur isolé de grenouille, concluent que Na interférerait avec Ca dans le coeur et qu'il y avait compétition vis à vis d'un site anionique inclu dans la membrane des cellules. Depuis cette époque un travail immense a été réalisé, mobilisant de nombreuses équipes de chercheurs travaillant sur des espèces animales différentes.

MOULIN et WILBRANDT (93) travaillèrent sur le coeur isolé de grenouille, J.B. KAHN (94) sur les érythrocytes humains, HUXLEY et HANSON (95) sur la cellule musculaire et la contraction musculaire, LEE et son équipe sur les muscles papillaires du chat (96), WILBRANDT et CAVIEZEL (97) étudièrent le mouvement des ions dans le muscle cardiaque soumis aux digitaliques en utilisant du calcium 45, F. SULSER (98) du potassium 42 avec le ventricule isolé de cobaye.

Ces quelques exemples ne suffisent évidemment pas à donner une idée exacte de l'ampleur du travail réalisé durant ces 20 dernières années et nous n'entrerons pas dans le détail de ces expériences très techniques et hautement spécialisées. Jusque vers 1962, il n'y a eu aucune

certitude en ce qui concerne le mécanisme d'action intime des cardénolides au niveau de la cellule musculaire cardiaque. De nombreuses hypothèses ont été émises, partiellement vérifiées mais aucune n'avait pu rendre compte de façon entièrement satisfaisante de tous les phénomènes observés après action des digitaliques. Ainsi on savait que l'action inotrope des cardénolides était très certainement indépendante de leurs effets métaboliques, qu'elle ne s'exerçait pas par l'intermédiaire de modifications importantes de la concentration intracellulaire des cation K^+ , Na^+ et Ca^{++} , ces phénomènes n'étant significatifs qu'au stade toxique. Il paraissait probable que ces drogues agissaient en modifiant le flux des cations et leur mobilisation intracellulaire, surtout celle du calcium.

1-6-2-3 Connaissances actuelles sur le mécanisme d'action des cardénolides.

Il est maintenant bien établi que les cardénolides exercent leur effet inotrope positif grâce à la présence de récepteurs spécifiques de nature enzymatique dans la membrane des cellules du muscle cardiaque. Ces récepteurs sont les ATPases (99 - 100). Ces enzymes sont impliqués dans le "transport" actif des ions sodium et potassium qui entrent ou sortent de la cellule à chaque contraction cardiaque. L'effet inotrope positif et la toxicité des digitaliques sur le coeur sont diminués ou supprimés par augmentation de la concentration en potassium dans le milieu. Cet antagonisme pourrait s'expliquer par une compétition entre les digitaliques et le potassium vis à vis du même site d'action à la surface extérieure de la cellule (101 - 102). Selon l'hypothèse la plus récemment émise, l'influx de sodium durant la phase de dépolarisation lors de la contraction musculaire, permettrait ou faciliterait l'attaque des digitaliques sur l'ATPase de transport (99 - 103). Il semblerait que la fonction carbonyle $\alpha \beta$ insaturée du cycle buténolide soit le groupement clef permettant la fixation de la molécule sur le récepteur enzymatique phosphorylé : en effet, il y aurait formation d'une liaison hydrogène avec un groupement OH du résidu acide phosphorique (104). La formation du complexe enzyme-inhibiteur empêcherait ainsi l'accès du potassium vers l'enzyme phosphorylée, d'où l'inhibition de la phosphorolyse dépendant de K^+

et inhibition de tout le système ATPase.

Cependant, le cycle lactonique ne joue un rôle capital que lorsqu'il est orienté en β en position 17 et vraisemblablement l'hydroxyle en C₃ facilite l'approche de la molécule à la surface de l'enzyme (11). D'après les différentes expériences d'inhibition de l'ATPase par les digitaliques et l'étude des relations : dose-activité, il semblerait que l'action thérapeutique des glycosides cardiotoniques soit liée à une inhibition modérée de l'ATPase de transport, leurs effets toxiques à une inhibition très forte de cette ATPase (102 - 105).

Plus récemment, KLEIN et BOUYARD (35) ont montré l'importance du rôle joué par les amines adrénérgiques dans le fonctionnement normal et la pathologie du myocarde. Etudiant les interactions possibles entre les hétérosides digitaliques et les catécholamines, KLEIN a montré expérimentalement que les substances digitaliques agissent sur le myocarde en intervenant dans la dynamique des catécholamines cardiaques (106). Ces auteurs ont émis une hypothèse nouvelle concernant le mécanisme d'action des glycosides digitaliques : les cardiotoniques augmenteraient la force contractile cardiaque, en inhibant l'ATPase de transport qui intervient dans le repompage des catécholamines au niveau des structures nerveuses terminales intracardiaques (107).

1-7 PRESENTATION DE NOTRE TRAVAIL

Le but de notre travail a été, dans un premier temps, de synthétiser des analogues nouveaux de cardénolides.

A la lumière des différentes relations qui ont pu être dégagées entre la structure et l'activité cardiotonique des cardénolides naturels, et en nous inspirant des travaux réalisés dans le domaine de la synthèse partielle puis de la synthèse totale et notamment des travaux de SCHMITT (32 - 34), nous avons tiré les conclusions suivantes, qui ont orienté notre travail :

- le squelette de base stérolique des cardénolides naturels, peut être remplacé par des molécules plus simples pourvu que ces molécules, par leurs dimensions et leur structure générale respectent une certaine analogie avec les stérols (figure 12).

- la fonction lactone α β insaturée est indispensable à l'activité cardiotonique.

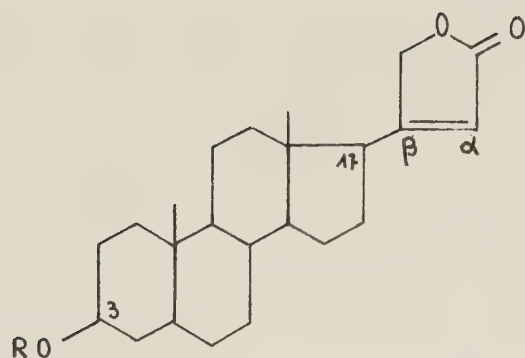
- la copule glucidique et la liaison osidique sont également de toute première importance pour l'activité et particulièrement pour l'activité in vivo.

D'autre part, parmi les monosides naturels ou hémisynthétiques, les glucosides sont presque toujours les plus actifs.

Ces faits nous ont conduit à synthétiser trois nouveaux glucosides de désoxybenzoïnes et un nouveau glucoside de flavone comportant une fonction lactone dans une position telle que l'analogie tout au moins dans les formules développées, avec les cardénolides naturels soit respectée (Figure 12).

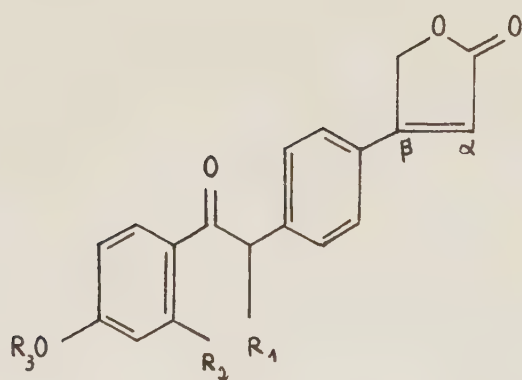
Puis dans un deuxième temps, nous avons étudié le comportement biochimique de ces glucosides vis à vis des ATP ases dépendant de Na^+ K^+ et Mg^{++} des érythrocytes de lapin, comparativement à l'ouabaïne.

Figure 12



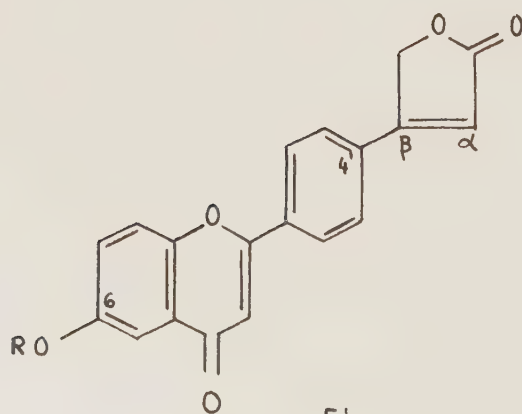
R : ose

Cardénolide



$R_1 = H, C_2H_5$
 $R_2 = H, OH$
 $R_3 = \text{glucose}$

Désoxybenzoïne



R : glucose

Flavone

2. SYNTHESE DES GLUCOSIDES DE DESOXYBENZOINES

PLAN

- 2.1 Introduction - Motivation des synthèses
- 2.2 Principe des synthèses chimiques réalisées
- 2.3 Détermination de la structure des dérivés lactoniques synthétisés
Caractéristiques spectrales et chromatographiques communes à tous
ces dérivés
- 2.4 Partie expérimentale

2-1 INTRODUCTION - MOTIVATION DES SYNTHESSES

A la lumière des différentes relations qui ont pu être dégagées, entre la structure des cardénolides naturels ou hémisynthétiques et leur activité cardiotonique, nous avons cherché à synthétiser des analogues qui comportent un cycle butène-2, olide-4 (ou fonction lactone) et un ose (glucose) relié par une liaison osidique à un squelette carboné de dimensions moléculaires et de structure telles que l'analogie avec le squelette de base cholanique des cardénolides naturels soit respectée. Or, pour synthétiser de tels analogues, deux démarches étaient possibles :

- Réaliser d'abord la fonction lactone sur un cycle simple, le noyau phényle, puis élaborer ensuite le squelette envisagé, par des réactions classiques de chimie organique.

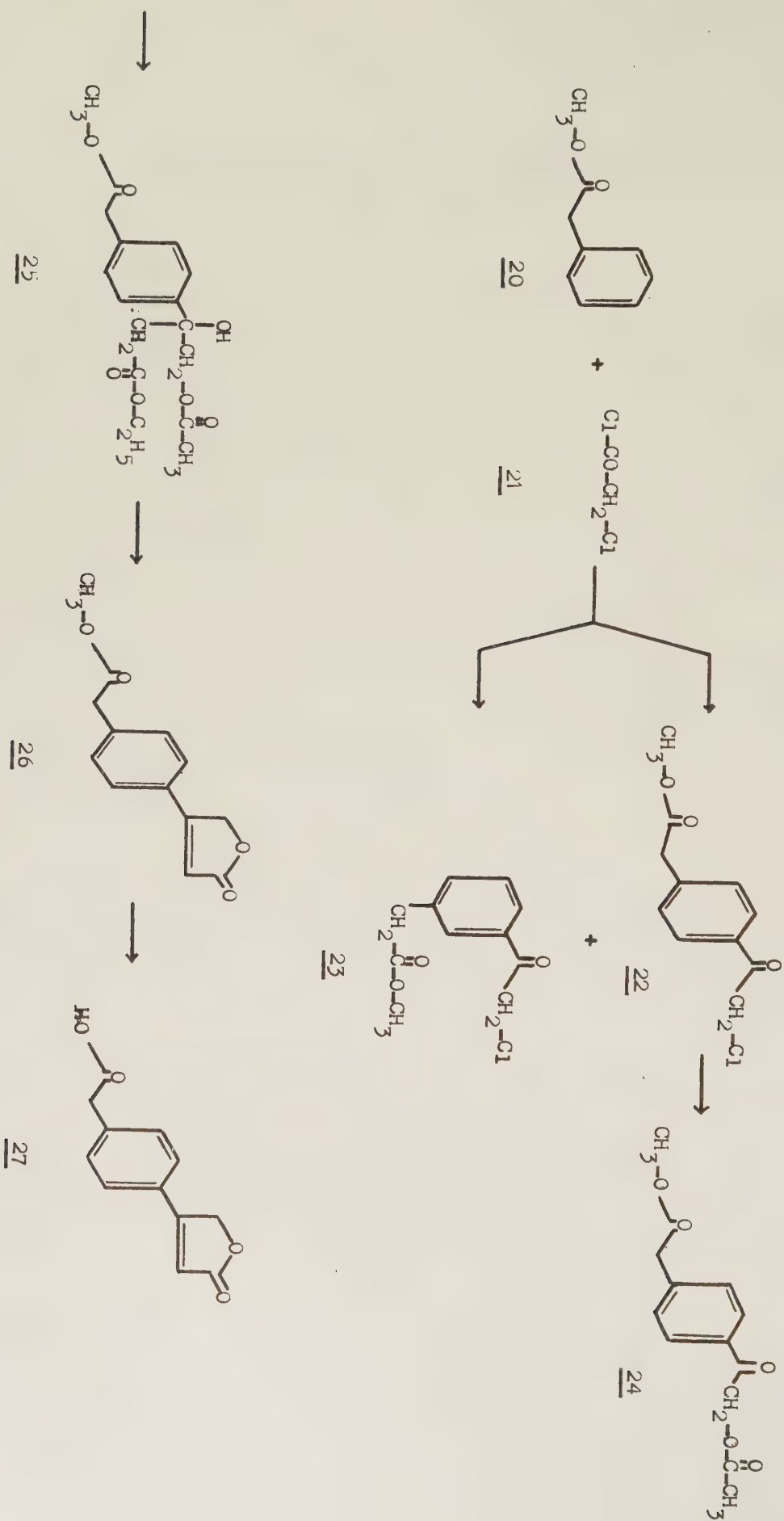
- Synthétiser d'abord le squelette carboné analogue du squelette cholanique des génines cardiotoniques naturelles, en introduisant en position convenable une fonction permettant de fixer, en fin de synthèse, la fonction lactone.

Dans les deux cas, la glucosylation, une étape délicate, doit être réalisée en dernier lieu car la liaison osidique est très sensible en milieu acide (risque notamment d'hydrolyse), et les oses sont labiles en milieu alcalin.

La première méthode nous a permis d'accéder aux glucosides de désoxybenzoïnes. Elle présente cependant quelques inconvénients car le cycle lactonique $\alpha\beta$ insaturé est particulièrement labile en milieu alcalin. De ce fait, une fois que la fonction lactone a été réalisée, les réactions ultérieures permettant de construire le squelette de base sont limitées car il faut toujours opérer en milieu acide ou neutre.

Il nous a donc semblé, par la suite, intéressant de nous orienter vers la deuxième méthode. Nous avons ainsi synthétisé le glucoside de flavone (glucosyloxy-6 (buténolide $\beta,\Delta\alpha-\beta$) - 4' flavone). Dans cette deuxième voie, la synthèse du squelette de base est aisée car les réactions ne sont pas limitées par les conditions de PH mais la réalisation de la fonction lactone est beaucoup plus laborieuse.

Figure 13



2-2 PRINCIPE DES SYNTHÈSES CHIMIQUES RÉALISÉES

Pour synthétiser les désoxybenzoïnes lactoniques, nous avons pris comme point de départ les travaux de SCHMITT (32) et ses collaborateurs. Ces auteurs ont préparé la désoxybenzoïne (28) mais n'ont pas poursuivi la synthèse dans ce domaine. Ils se sont orientés par la suite vers d'autres molécules lactoniques plus simples. Nous avons donc repris la synthèse de la désoxybenzoïne (28) suivant la technique proposée par SCHMITT, puis nous avons mis au point la déméthylation (30) et la glucosylation (32) de cette désoxybenzoïne. Par ailleurs, nous avons préparé deux désoxybenzoïnes homologues nouvelles (29) et (56) et mis au point de même, la déméthylation (57) et la glucosylation (34) et (59).

2-2-1 Synthèse des désoxybenzoïnes dérivant de l'acide phénylacétique : (Figure 13 et 14)

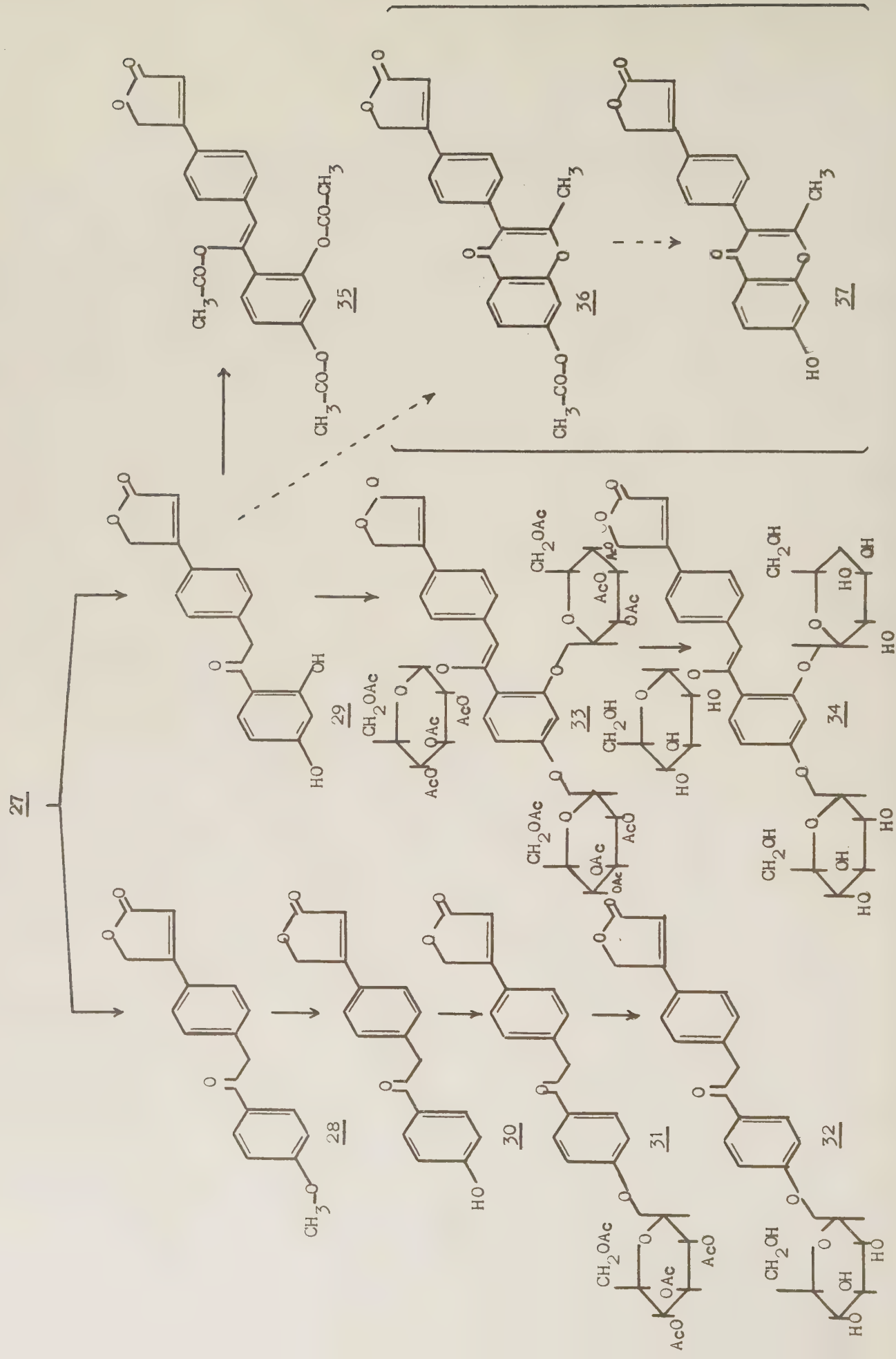
2-2-1-1 Synthèse de l'acide lactonique (27) (Figure 13).

Elle a été réalisée d'après les travaux de SCHMITT (32). Les cétones α chlorées (22) et (23) sont obtenues selon FRIEDEL et CRAFTS par action du chlorure de chloracétyle sur l'ester méthylique de l'acide phénylacétique. Seule la cétone (22) est utilisée pour la suite des réactions. Les deux isomères sont donc séparés puis le chlore est échangé contre le radical acétoxy par action de l'acétate de sodium dans l'anhydride acétique.

L'acétoxyméthyl cétone (24), traitée par le bromacétate d'éthyle et la poudre de zinc selon REFORMAISKY, conduit au dérivé (25) qui n'est pas isolé. En effet la déshydratation et la cyclisation, donnant l'ester méthylique lactonique (26) se produit directement par action de la chaleur lors de la distillation du dérivé (25) intermédiaire.

L'acide lactonique (27) est obtenu aisément par hydrolyse de l'ester méthylique (26) en présence d'acide bromhydrique.

Figure 14



2-2-1-2 Synthèse des désoxybenzoïnes (28) (29) et (30) (Figure 14)

A partir de l'acide lactonique ou plus exactement de son chlorure d'acide, nous avons orienté la synthèse dans deux voies différentes :

- réaction de FRIEDEL et CRAFTS sur l'anisol, cette condensation conduisant à la désoxybenzoïne (28) déjà connue (32).
- réaction de FRIEDEL et CRAFT sur la résorcine, cette condensation conduisant à la désoxybenzoïne dihydroxylée (29) nouvelle.

Notre but étant de préparer les glucosides des désoxybenzoïnes, il s'est avéré nécessaire pour la désoxybenzoïne (28) de libérer le groupement hydroxyle en position para par rapport à la fonction cétone. Nous avons donc réalisé une déméthylation par chauffage en milieu acide acétique - acide bromhydrique, suivant une technique décrite par N.P. CAMPBELL et J.H. HUNT (31) pour la déméthylation de composés dérivés du stilboestrol. Cette déméthylation conduit à la désoxybenzoïne (30).

2-2-1-3 Synthèse des glucosides (32) et (34)

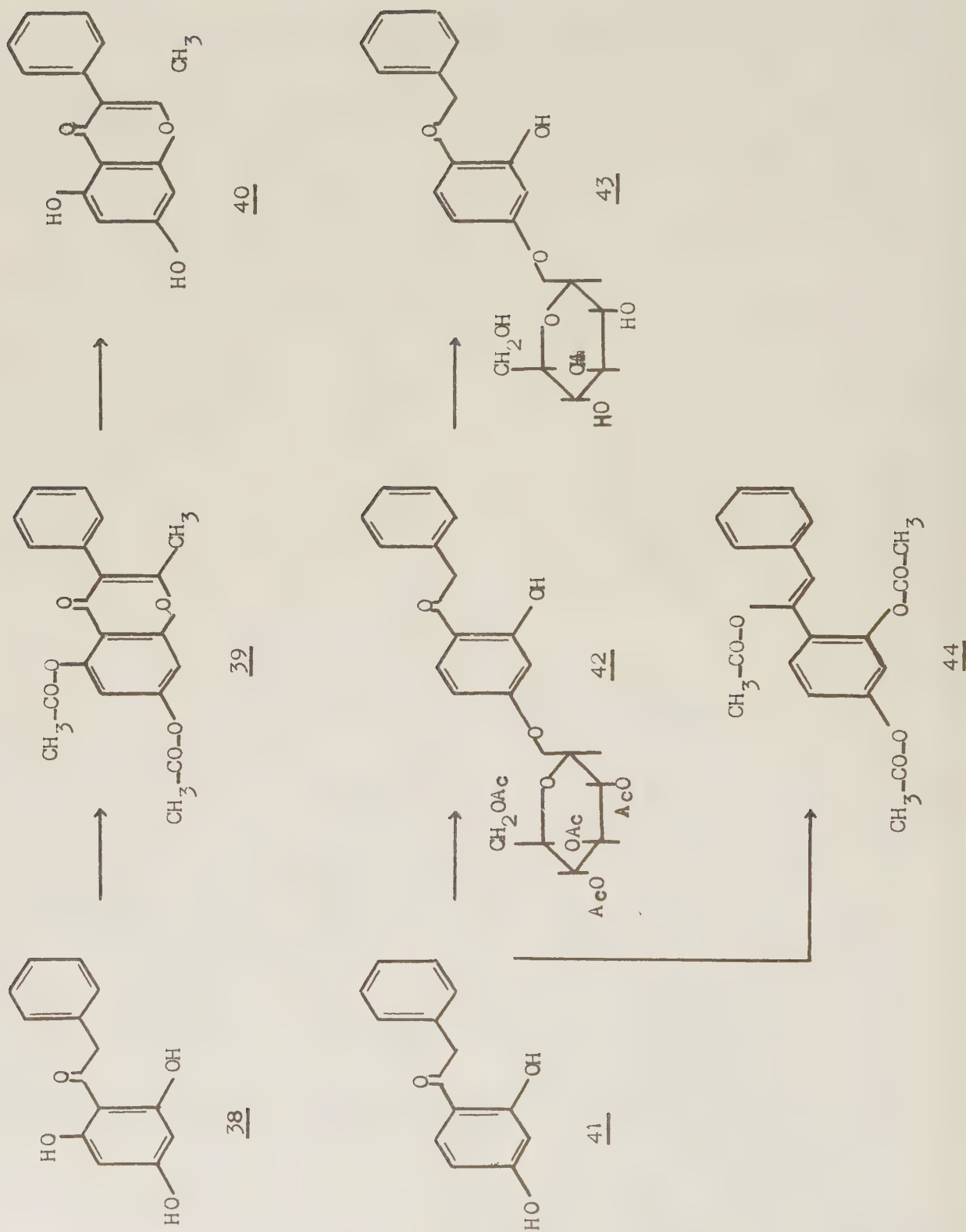
La synthèse du monoglucoside acétylé (31) a été réalisée par action de l' α bromo-tétraacétyl-2,3,4,6, D-glucopyranose en solution dans le benzène, sur une solution quinoléinique de désoxybenzoïne (30), en présence d'oxyde d'argent selon la méthode de KOENIGS-KNORR (108). Le monoglucoside tétraacétylé (31) est désacétylé selon la technique de FUJISE et MITUI (109), c'est à dire par traitement rapide à 0°. du composé par une solution de soude à 2 % dans le méthanol.

Ce procédé de glucosylation a été étudié pour la synthèse de mono et di -O glucosylflavonols (110).

La désacétylation du monoglucoside acétylé (31) conduit au monoglucoside libre (32).

La glucosylation de la désoxybenzoïne dihydroxylée (29) a été réalisée selon la même technique que celle utilisée pour la préparation du monoglucoside acétylé (31) de la désoxybenzoïne (30). Alors que nous attendions un monoglucoside ou un diglucoside acétylé, nous avons obtenu le triglucoside

Figure 15



acétylé (33) . Sa désacétylation conduisant au triglucoside (34) a été réalisée de même, selon la technique habituelle de FUJISE et MITUI (109).

Dans cette expérience, le groupement cétonique : $\overset{\text{O}}{\text{C}}-\text{CH}_2-$ de la désoxybenzoïne dihydroxylée (29) s'est donc énoisé pour donner la forme :

$-\text{C}=\text{C} \text{ H}-$, d'où la formation du triglucoside (34). Or, cette possibilité

d'énolisation de la désoxybenzoïne (29) a été confirmée par les faits suivants :

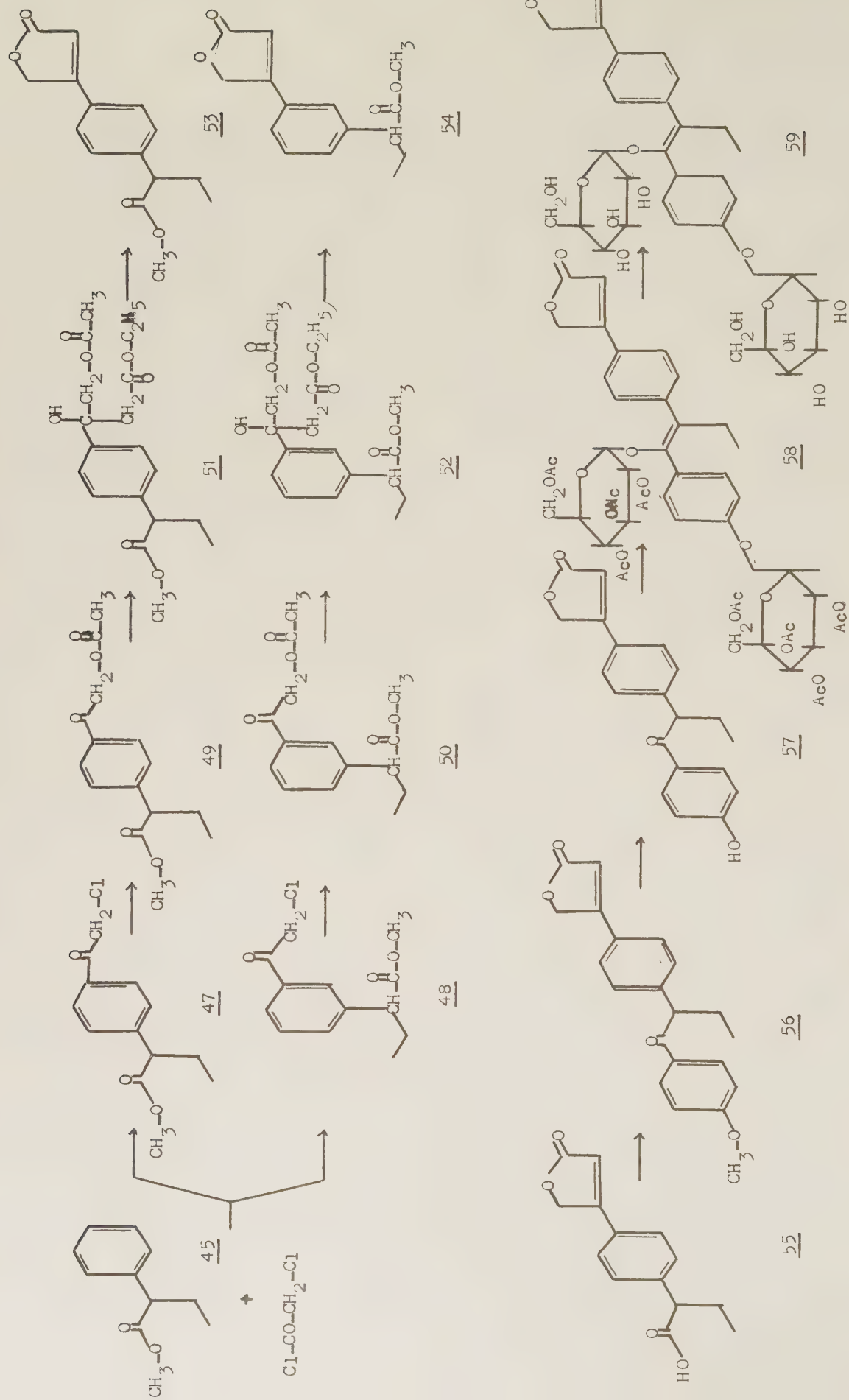
En effet, compte tenu des propriétés oestrogènes des isoflavones dues à leur parenté structurale avec l'oestrone, nous voulions préparer une isoflavone à cycle buténolide en 4'. Il existe une méthode de synthèse simple d'isoflavones à partir de désoxybenzoïnes hydroxylées, mais ne comportant pas le cycle buténolide : des désoxybenzoïnes dihydroxylées en 2,4, soumises à l'action de l'anhydride acétique et de l'acétate de sodium ou de la pyridine sont cyclisées en méthyl-2 isoflavones monoacétylées (111).

Ainsi, par exemple, la trihydroxy-2,4,6 désoxybenzoïne (38) en présence d'anhydride acétique et de pyridine conduit à la diacétoxy-5,7 méthyl-2 isoflavone (39) puis à la dihydroxy-5,7 méthyl-2 isoflavone (40) après désacétylation (112) (Figure 15).

En soumettant la désoxybenzoïne (29) à l'action de l'anhydride acétique et de la pyridine dans les proportions 10 pour 1, pendant 5 heures, nous pensions obtenir l'acétoxy-7 méthyl-2 (buténolide $\beta\Delta\alpha\beta$) - 4' isoflavone (36), cette méthode de cyclisation douce n'altérant pas la fonction lactone. Or, nous avons obtenu le triacétate de désoxybenzoïne (35) et non l'isoflavone attendue. Par conséquent, dans les conditions expérimentales où nous avons opéré, la fonction cétone de la désoxybenzoïne (29) s'est énoisée pour donner le triacétate de désoxybenzoïne (35), résultat comparable à celui que nous avons obtenu lors de la glucosylation.

Nous nous sommes demandé si cette grande facilité d'énolisation de la désoxybenzoïne (29) n'était pas induite, du moins en partie, par la présence du cycle buténolide $\alpha \beta$ insaturé. L'ensemble de la molécule présente en effet un système de doubles liaisons conjuguées qui peut conférer à la fonction cétone des propriétés particulières. Dans le but de vérifier cette hypothèse, nous avons synthétisé la dihydroxy-2,4 désoxybenzoïne (41) sans

Figure 16



fonction lactone, selon une méthode calquée exactement sur celle qui nous a permis d'accéder à la désoxybenzoïne (29).

En respectant rigoureusement les conditions expérimentales, nous avons réalisé la glucosylation d'une part, et soumis cette molécule à l'action de l'anhydride acétique et de la pyridine d'autre part. La glucosylation nous a conduits au monoglucoside acétylé (42), puis par désacétylation au monoglucoside (43), tandis que le traitement par anhydride acétique-pyridine a donné le triacétate de désoxybenzoïne (44) (Figure 15).

S'il apparaît clairement que, dans le cas de la glucosylation, la présence de la fonction lactone dans la molécule de dihydroxy-2,4 désoxybenzoïne induit la formation d'un triglucoside, les conclusions sont beaucoup moins nettes en ce qui concerne le traitement par anhydride acétique - pyridine puisque dans les deux cas (avec et sans fonction lactone) nous obtenons un triacétate.

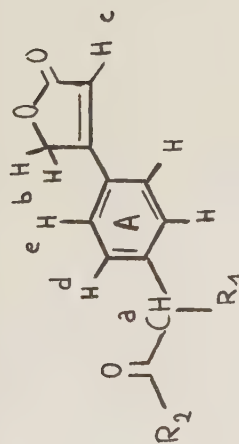
Il est permis de penser que, dans ce deuxième cas, ce sont alors les conditions expérimentales qui déterminent de façon prépondérante l'énolisation des deux désoxybenzoïnes (29) et (41).

En effet, tout récemment, T. SZELL et ses collaborateurs (136), étudiant la réaction d'acétylation, dite : réaction de KOSTANECKI-ROBINSON, de trihydroxy-2,4,6 et de dihydroxy-2,4 méthoxy-4' désoxybenzoïnes, conduisant aux isoflavones correspondantes, ont observé dans la plupart des cas, la formation intermédiaire des acétates d'énol, étape lente, suivie d'une cyclisation rapide en isoflavones.

Lorsque l'acétylation est conduite en milieu anhydride acétique-pyridine, la réaction s'arrête même très souvent au stade de l'acétate d'énol intermédiaire. C'est ainsi que ces auteurs ont préparés le triacétate de désoxybenzoïne (44), à partir de la désoxybenzoïne (41). En utilisant ce procédé d'acétylation : anhydride acétique-pyridine, ils n'ont pas pu aller jusqu'au stade de l'isoflavone.

Notons que les désoxybenzoïnes (42), (43) sont des composés connus. Ils avaient été préparés antérieurement par ZEMPLÉN et ses collaborateurs (113) selon une méthode tout à fait différente qui utilisait la glucosyloxy-7 isoflavone comme matière première de départ.

Tableau 1 - Déplacement chimique des protons des acides et esters lactoniques synthétisés



N°	R ₁	R ₂	a		b		c		Aromatiques		O-CH ₃		R ₁	
			δ	J	δ	J	δ	J	d et e	J	δ	J	CH ₃	CH ₂
<u>27</u>	H	OH	3,58	s	5,22	d,2	6,52	t,2	7,22 7,50	δ	δ	J	δ	J
<u>53</u>	CH ₃ -CH ₂	O-CH ₃	3,66	t,7,5	5,38	d,2	6,71	t,2	7,42 7,72	δ	3,60	s	0,83	t,7,5
<u>55</u>	CH ₃ -CH ₂	OH	3,54	t,7,5	5,36	d,2	6,69	t,2	7,42 7,72	δ			0,83	t,7,5

δ : déplacement chimique en ppm

J : constante de couplage en Hertz

s : singulet

d : doublet

t : triplet

δ : sextuplet

solvant : DMSO

Ces auteurs n'ont pas préparé toutefois le triacétate de désoxybenzoïne (44).

2-2-2 Synthèse des désoxybenzoïnes dérivant de l'acide phényl α éthyl-acétique
(ou acide phényl-2 butyrique) (Figure 16)

Encouragés par l'activité cardiotonique importante du monoglucoside (32), nous avons entrepris suivant le même principe, la synthèse d'un nouveau glucoside, en remplaçant l'acide phénylatétique de départ par l'acide phényl-2 butyrique.

Nous avons choisi l'acide phényl-2 butyrique dans le but d'améliorer l'analogie de structure avec la génine des cardénolides stéroliques naturels. Notons aussi l'analogie du squelette ainsi construit avec le stilboestrol, doué de propriétés oestrogènes.

2-2-2-1 Synthèse de l'acide lactonique (55).

Le phényl α éthyl-acétate de méthyle (45) est d'abord préparé par réaction classique d'estérification de l'acide phényl α éthyl-acétique par le méthanol, en milieu sulfurique.

Les cétones α chlorées (47) et (48) sont obtenues comme précédemment, selon FRIEDEL et CRAFTS par action du chlorure de chloracétyle sur l'ester méthylique (45) de l'acide phényl α éthyl-acétique. Le mélange des deux isomères para (47) et méta (48) soumis à l'action de l'acétate de sodium dans l'anhydride acétique conduit aux acétoxyméthylcétones para (49) et méta (50). Le mélange des deux acétoxyméthylcétones isomères, traité par le bromacétate d'éthyle et la poudre de zinc selon REFORMATSKY conduit aux dérivés (51) et (52) non isolés.

Les deux isomères (53) et (54) sont obtenus directement par déshydratation et cyclisation, lors de la distillation du mélange des isomères non isolés (51) et (52). A ce stade, les deux isomères para et méta sont séparés

par cristallisation fractionnée. Seul l'isomère para prépondérant dans le mélange est retenu pour la suite de la synthèse.

Comme dans la série précédente l'acide lactonique (55) est obtenu facilement par hydrolyse de l'ester méthylique (53) en présence d'acide bromhydrique.

2-2-2-2 Synthèse des désoxybenzoïnes (56) et (57).

La désoxybenzoïne (56) est préparée par condensation selon FRIEDEL et CRAFTS, de l'anisol sur le chlorure de l'acide lactonique (55). La désoxybenzoïne (57) est obtenue par déméthylation, en milieu acide acétique - acide bromhydrique, de la désoxybenzoïne (56).

2-2-2-3 Synthèse du diglucoside (59).

La synthèse du diglucoside acétylé (58) à partir de la désoxybenzoïne (57) a été réalisée selon la même technique que celle utilisée pour la préparation du monoglucoside acétylé (31) et du triglucoside acétylé (33) : action de l' α bromo tétraacétyl-2,3,4,6 D-glucopyranose, en solution dans le benzène, sur une solution quinoléinique de désoxybenzoïne (57) en présence d'oxyde d'argent (108). La désacétylation, conduisant au diglucoside libre (59), a été réalisée selon la technique habituelle de FUJISE et MITUI (109).

2-3 DETERMINATION DE LA STRUCTURE DES DERIVES LACTONIQUES SYNTHETISES
CARACTERISTIQUES SPECTRALES ET CHROMATOGRAPHIQUES COMMUNES A TOUS CES DERIVES

Les structures des dérivés (22 à 28) déjà préparés par SCHMITT et ses collaborateurs, qui ont servi de matière première de départ pour la synthèse de nos désoxybenzoïnes, n'avaient pas été confirmées par les méthodes spectrales classiques d'analyse : UV, IR, et surtout RMN. Seules les structures des cétones α chlorées (22) et (23) ont été établies par une argumentation chimique laborieuse.

Nous avons donc vérifié la structure des composés déjà connus par l'étude des spectres RMN principalement et aussi UV et IR, et de plus, confirmé leur pureté. Nous avons également déterminé la structure et vérifié la pureté des composés nouveaux préparés par RMN et chromatographie en couche mince.

2-3-1 Identification de la fonction lactone

2-3-1-1 Spectres RMN (Tableaux I, II et III)

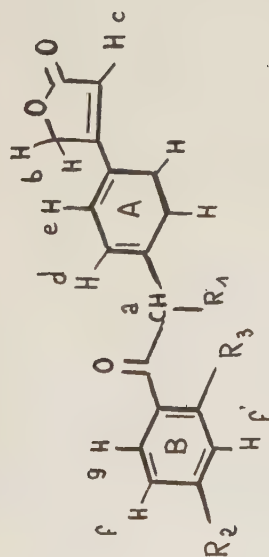
Les deux protons en b sont équivalents et couplés avec le proton c par vinylogie (couplage méta). Ils donnent donc un doublet entre 5,2 et 5,4 ppm $J_{bc} = 2$ Hertz

Le proton c est, de même, couplé aux deux protons en b par vinylogie (couplage méta). Il donne un triplet centré entre 6,5 et 6,9 ppm $J_{cb} = 2$ Hertz

2-3-1-2 Spectres Infra Rouge (Tableau IV)

Le groupement carbonyle de la fonction lactone donne une bande dédoublée entre 1740 et 1795 cm^{-1} : soit deux pics, soit un pic et un épaulement.

Tableau II - Déplacement chimique des protons des désoxybenzoïnes lactoniques, sous forme cétonique, diversement substituées.



N°	R ₁	R ₂	R ₃	a				b				c				Aromatiques					O-CH ₃		R ₁	
				δ		J	δ	δ		J	δ	δ		J	δ	ff'	g		J	δ		J	CH ₃	
28	H	O-CH ₃	H	4,40	s		5,34	δ	δ	J	δ	6,66	δ	J	δ	7,02	d,8	δ	J	δ	δ	J	δ	CH ₂
29	H	OH	OH	4,38	s		5,36	δ	δ	J	δ	6,68	δ	J	δ	7,02	d,8	δ	J	δ	3,82	s	δ	J
30	H	OH	H	4,34	s		5,33	δ	δ	J	δ	6,64	δ	J	δ	6,40	d,8	δ	J	δ	7,96	d,9	δ	J
56	CH ₃ -CH ₂	O-CH ₃	H	3,58	t		5,47	δ	δ	J	δ	6,83	δ	J	δ	6,84	d,8	δ	J	δ	3,88	s	0,85	t,7,5
57	CH ₃ -CH ₂	OH	H	3,78	t		5,32	δ	δ	J	δ	6,9	δ	J	δ	7,14	d,8	δ	J	δ	8,22	d,9	0,85	t,7,5
31	H	O-gl-Ac	H	4,42	s		5,34	δ	δ	J	δ	6,65	δ	J	δ	7,02	d,8	δ	J	δ	8,06	d,9	0,85	t,7,5

Ce dédoublement est caractéristique des γ lactones α β insaturées.

2-3-1-3 Chromatographie en couche mince (Tableau IV)

Les composés ayant une fonction lactone intacte sont révélés (couleur pourpre à violette) par le réactif de Kedde (114), réactif spécifique des lactones pentacycliques α β insaturées.

Toutes ces conditions doivent être réunies pour affirmer que l'intégrité de la fonction lactone a bien été respectée.

Ceci est particulièrement important lorsque les composés cristallisent avec une molécule d'eau. En effet, dans ce cas l'analyse élémentaire laisse une ambiguïté : la molécule d'eau supplémentaire montrée par l'analyse pourrait être due à l'hydratation de la fonction lactone. L'étude spectrale et chromatographique est alors particulièrement nécessaire pour prouver que la molécule d'eau observée est bien une molécule d'eau de cristallisation.

2-3-2 Substitution des acides phényl et phényl α éthyl-acétique : noyau A, (Tableau I) ester (53) et acides lactoniques (27) et (55)

Le fait d'obtenir deux doublets et couplage ortho $J=8$ Hertz pour les protons aromatiques d, d', e et e' prouve que :

- Les protons d et d' sont équivalents
- Les protons e et e' sont équivalents

et que par conséquent, la fonction lactone a bien été greffée en para, sur le noyau phényle, par rapport au groupement R_2 -CO-CH (R_1).

Cette structure se retrouve dans toutes les désoxybenzoïnes suivantes :

2-3-3 Substitution du noyau B (tableau II)

2-3-3-1 $R_3 = H$: désoxybenzoïne (28), (30), (56) et (57)

Le fait d'obtenir deux doublets de couplage ortho $J = 9$ Hertz pour les protons aromatiques f, f', g et R_3 prouve de même que :

- Les protons f et f' sont équivalents

- Les protons g et R_3 sont équivalents

et que par conséquent, les acides phényl et phényl α éthyl acétique se sont bien greffés en para du groupement méthoxyle sur l'anisol.

2-3-3-2 $R_3 = OH$: désoxybenzoïne (29)

- Le proton g couplé avec le proton f donne un doublet à 7,96 ppm $J = 9,5$ Hertz ;

- Le proton f est couplé à la fois avec g (couplage ortho) et f' (couplage méta), d'où la présence d'un quadruplet à 6,40 ppm ;

- Le proton f' est couplé avec le proton f (couplage méta) d'où la présence d'un doublet à 6,30 ppm $J = 2$ Hertz, ce qui confirme la structure proposée pour la désoxybenzoïne (29).

Le spectre RMN de la désoxybenzoïne (41) sans fonction lactone présente sensiblement la même disposition des pics f, f' et g avec les mêmes constantes de couplage : la désoxybenzoïne (41) est bien la dihydroxy 2-4 désoxybenzoïne comme nous l'avions proposé.

2-3-4 Triacétate de désoxybenzoïne (35) et (44)

2-3-4-1 Triacétate de désoxybenzoïne (35)

Outre l'analyse élémentaire, les arguments permettant d'affirmer que le traitement de la désoxybenzoïne (29) par l'anhydride acétique et la pyridine, pendant 5 heures, conduit non pas à l'isoflavone (37) mais au

Tableau IV - Etude spectrale et chromatographique des déoxybenzoïnes préparées

N°	Spectres UV: Ethanol 95°		Spectres IR: pastillage dans KBr			Chromatographie en couche mince	
	$\lambda_{\max}$ nm	Log ϵ	$\nu_{\text{CO lact.}}$	$\nu_{\text{CO désoxy.}}$	ν_{CH}	Solvants	R _f
<u>28</u>	282	4,42	1740 1780	1675		Benzène-MeOH 90-20 Acétone-benzène 1-2	0,44 0,70
<u>29</u>	283	4,48	1740 1780	1640	3280 3400 $\nu_{\text{H}_2\text{O}}$	Benzène-MeOH 90-20 Acétone-benzène 1-2	0,31 0,63
<u>30</u>	285	4,48	1760 1790	1680	3300	Benzène-MeOH 90-20 Acétone-Benzène 1-2	0,36 0,56
<u>31</u>	218 281	3,99 4,46				Acétone-benzène 1-2 n-But/AcOH/H ₂ O 4-1-5	0,58 0,92
<u>32</u>	276	3,56	1740 1790 e	1675	3350	Acétone-benzène 1-2 n-But/AcOH/H ₂ O 4-1-5	0 0,47
<u>33</u>	278	4,49	1760 1795 e	-	3450 $\nu_{\text{H}_2\text{O}}$	Acétone-benzène 1-2 n-But/AcOH/H ₂ O 4-1-5	0,63 0,83
<u>34</u>	275	4,47	1740 1780 e	-	3350	n-But/AcOH/H ₂ O 4-1-5 Ethanol-eau 3-2	0,2 0,98
<u>35</u>	305	4,2	1780	-		Benzène-MeOH 90-20 Acétone-benzène 1-2	0,88 0,84

triacétate (35) sont les suivants :

- Spectre IR : pas de bande carbonyle correspondant au groupement cétone de la désoxybenzoïne ; seule la bande large à 1780 cm^{-1} (5,62) subsiste.

Elle correspond au carbonyle de la fonction lactone et à la fonction ester des groupements "acétate".

- Spectre UV : Le spectre se rapproche de celui des stilbènes :

triacétate 35 : $\lambda_{\text{Max}} = 305\text{ nm}$

trans stilbène : $\lambda_{\text{Max}} = 295\text{ nm}$

D'autre part le produit résultant de l'hydrolyse chlorhydrique du triacétate (35), s'est avéré identique à la désoxybenzoïne (29) de départ. De nombreux arguments prouvent cette identité :

- Chromatographie en couche mince sur Silicagel G dans acétone - benzène (1-2) l'hydrolysât a même R_f qu'un échantillon témoin de désoxybenzoïne (29) $R_f = 0,51$

- Spectre UV : hydrolysât : $\lambda_{\text{Max}} = 280\text{ nm}$

(29) : $\lambda_{\text{Max}} = 280\text{ nm}$

- Spectre IR : les spectres réalisés pour chacun des produits dans les mêmes conditions sont rigoureusement superposables.

Les points de fusion sont sensiblement identiques : $250-254^\circ$ et le point de fusion mélangé n'est pas abaissé.

2-3-4-2 : Triacétate de désoxybenzoïne (44)

L'analyse élémentaire du dérivé (44) est celle du triacétate.

La structure du triacétate de désoxybenzoïne (44) a été confirmée essentiellement par l'étude spectrale R M N et Infra Rouge. Le spectre R M N du dérivé (44) présente à 2,2 et 2,28 ppm deux pics importants correspondant globalement à 9 protons donc 3 groupements acétate $\text{CH}_3\text{-COO}$. Le dérivé (44) est bien un triacétate.

D'autre part, le spectre se caractérise par l'absence à 4,4 ppm du pic caractéristique des deux protons adjacents à la fonction cétone des désoxybenzoïnes sous forme cétonique : $\text{-CO-CH}_2\text{-}$; la désoxybenzoïne (44) est

Tableau IV (suite) - Etude spectrale et chromatographique des désoxybenzoïnes préparées.

N°	Spectres UV: Ethanol 95°		Spectres IR: pastillage dans KBr			Chromatographie en couche mince	Rf
	λ Max nm	Log ϵ	ν CO lact.	ν CO désoxy.	ν OH		
<u>41</u>	280 315	4,20 3,98	-	1640	3250	Acétone-benzène 1-2	0,82
<u>42</u>	267 318	4,04 3,79	-	1680		Acétone-benzène 1-2 n-But/AcOH/H ₂ O 4-1-5	0,59 0,92
<u>43</u>	275 320	3,95 3,70	-	1635	3350	Acétone-benzène 1-2 n-But/AcOH/H ₂ O 4-1-5	0 0,28
<u>44</u>	275	4,48	-	1675		Acétone-benzène 1-2	0,89
<u>56</u>	218 280	4,39 4,53	1770 1795 e	1670		Acétone-benzène 1-2	0,76
<u>57</u>	218 272	4,35 4,40	1740 1780 e	1670	3280 3450 ν H ₂ O	Acétone-benzène 1-2	0,62
<u>58</u>	217 269	4,42 4,45	1775 e			Acétone-benzène 1-2 n-But/AcOH/H ₂ O 4-1-5	0,50 0,89
<u>59</u>	218 273	4,15 4,24	1740 1790 e		3350 3450 ν H ₂ O	n-But/AcOH/H ₂ O 4-1-5	0,36

e : épaulement

révélateur de chromatographie : réactif de KEDDE

donc sous la forme énolique $\begin{array}{c} -\text{C} = \text{CH}- \\ | \\ \text{OH} \end{array}$

Effectivement, le spectre présente à 6,55 ppm un singulet qui correspond au proton éthylénique caractéristique de la forme énolique.

Le spectre R M N du triacétate (35) (Tableau III) présente les mêmes caractéristiques.

Comme pour le triacétate (35), le spectre IR du triacétate de désoxybenzoïne (44) ne montre pas de bande carbonyle dans la région 1640-1680 cm^{-1} mais seulement une bande large à 1780 cm^{-1} .

Le spectre UV a confirmé cette structure.

Les principales caractéristiques physiques sont identiques à celles données par T. SZELL (136).

2-3-5 Glucosides (32), (34), (59) et (43).

2-3-5-1 Monoglucoside (32).

Le spectre RMN du monoglucoside tétraacétylé (31) a permis de vérifier la présence d'un seul glucose. En effet, le spectre montre la présence de 4 groupements acétyle : $\text{CH}_3 - \text{COO}$ (12 protons, le glucose étant tétraacétylé).

D'autre part, après hydrolyse chlorhydrique totale du monoglucoside libre (32), le glucose libéré dans l'hydrolysate est dosé comparativement à un échantillon de glucose témoin, par chromatographie sur papier. Le résultat du dosage donne 1 glucose par molécule de glucoside avec une précision de l'ordre de 10 %, compte tenu de la dégradation partielle du glucose par l'hydrolyse chlorhydrique et de la méthode de dosage.

2-3-5-2 Trigluoside (34).

Le spectre RMN du trigluoside acétylé (33) a permis de vérifier la

présence de 3 glucoses par molécule. En effet, le spectre montre la présence de 12 groupements acétyle : $\text{CH}_3 - \text{COO}$ (36 protons (= 3 x 12), chaque glucose étant tétraacétylé).

Après hydrolyse chlorhydrique du triglucoside libre (34), le dosage du glucose selon SCHAFFER-HARTMAN confirme la présence de 3 glucoses par molécule de glucoside.

2-3-5-3 Diglucoside (59)

L'étude spectrale RMN de la désoxybenzoïne (57) a montré la présence d'un pourcentage relativement élevé : 25 % de forme énolique. Cette facilité relative avec laquelle la désoxybenzoïne (57) peut s'énoliser en solution de pH neutre, nous avait laissé prévoir l'obtention d'un diglucoside et non d'un monoglucoside comme dans la série dérivant de l'acide phénylacétique.

La structure du diglucoside (59) a été établie et confirmée à l'aide des arguments suivants :

- Le spectre RMN du dérivé acétylé (58) montre la présence de 8 groupements acétyle : $\text{CH}_3 - \text{COO}$ soit 24 protons (chaque glucose est tétraacétylé), par conséquent présence de 2 glucoses.

Le spectre IR du dérivé acétylé (58) se caractérise par l'importance de la bande acétate ($1150 - 1350 \text{ cm}^{-1}$) et de la bande carbonyle : CO de l'ester acétique à 1770 cm^{-1} , par l'absence d'une bande carbonyle prononcée pour le CO de la désoxybenzoïne à 1680 cm^{-1} .

- Après hydrolyse chlorhydrique totale, le glucose libéré dans l'hydrolysate est dosé comparativement à un échantillon de glucose témoin. Le résultat du dosage selon SCHAFFER-HARTMAN confirme la présence de 2 glucoses par molécule de glucoside, avec une précision de l'ordre de 10 %, compte tenu de la dégradation partielle du glucose par l'hydrolyse chlorhydrique et de la méthode de dosage.

2-3-5-4 Monoglucoside (43).

Comme pour les autres glucosides, la structure du monoglucoside (43) a été vérifiée de façon indirecte, par l'étude spectrale RMN, Infra Rouge et Ultra Violette du monoglucoside acétylé (42) :

Les principales caractéristiques physiques du dérivé (42) synthétisé correspondent à celles décrites dans la littérature (113) (Tableau IV et VI).

2-4 PARTIE EXPERIMENTALE

Les principales caractéristiques physiques et les analyses élémentaires des composés nouveaux préparés sont consignées dans les tableaux V, VI et VII.

2-4-1 Préparation des acides lactoniques (27) et (55).

Les composés (22), (23), (24), (25) et (26) permettant d'accéder à l'acide lactonique (27) ont été préparés suivant le mode opératoire de SCHMITT et ses collaborateurs (32).

Les composés correspondants, dans la série phényl α éthylacétique, (47) (48), (49) et (50), (51) et (52), (53), composés nouveaux, ont été préparés suivant le même principe, avec quelques légères modifications :

Le mélange des cétones α chlorées (47) et (48) est une huile incristallisable. La distillation n'est pas suffisante pour séparer finement les deux isomères. C'est pourquoi, nous obtenons dans l'étape suivante les acétoxy-méthylcétones (49) et (50) à partir de l'huile purifiée deux fois par distillation.

De même, les esters méthyliques (53) et (54) sont formés à partir du mélange des acétoxy-méthylcétones (49) et (50) : huile purifiée par distillation.

Les deux isomères para et méta sont séparés au stade des esters méthyliques par cristallisation. La forme para (53), cristallise préférentiellement après dissolution dans l'éther anhydre de l'huile distillée, mélange des deux isomères. La séparation est améliorée par une nouvelle recristallisation dans l'alcool absolu. L'acide (55) est préparé comme l'acide (27).

2-4-2 Préparation des désoxybenzoïnes (28), (29), (41) et (56) selon FRIEDEL et CRAFTS

2-4-2-1 Désoxybenzoïne (28) : procédé de SCHMITT (32).

Modification :

Le chlorure de l'acide lactonique (27) est isolé, purifié par :
recristallisation dans le mélange benzène-hexane 2-1 :

cristaux jaunes F = 134-135°

La purification du chlorure avec élimination du chlorure de thionyle en excès permet d'améliorer le rendement en désoxybenzoïne (28) avec une bonne reproductibilité. En effet, la présence de chlorure de thionyle peut dans certains cas bloquer l'action du chlorure d'aluminium.

2-4-2-2 Désoxybenzoïne (56) : même procédé (32).

Le chlorure de l'acide lactonique (55) est une huile, purifiée par deux lavages successifs à l'hexane. Sa pureté est vérifiée par dosage du chlore selon CHARPENTIER-VOLLARD.

Modification de la condensation :

Le chlorure d'aluminium est ajouté par petites portions au mélange : chlorure d'acide + anisol.

En fin de réaction, après décomposition des complexes : $AlCl_3$

- produits de la réaction, la désoxybenzoïne (56) obtenue est une huile jaune clair. Elle est extraite au benzène. La phase benzénique est lavée deux fois avec 30 cm³ d'acide chlorhydrique dilué (1-1), avec de l'eau, puis avec 2x 30 cm³ de solution aqueuse de bicarbonate de sodium à 5 % et enfin avec de l'eau, jusqu'à neutralité. La phase organique est séchée sur sulfate de sodium. Le benzène et l'anisol sont éliminés au bain marie, sous pression réduite.

L'huile brune résiduelle est séchée au dessiccateur sous vide, en présence de P_2O_5 . Après 48 heures, elle durcit et devient cristalline.

2-4-2-3 Désoxybenzoïnes (29) et (41)

Désoxybenzoïne (29)

Chlorure de l'acide lactonique (27)

2 g (0,0092 mole) d'acide lactonique (27) et 10 cm³ de chlorure

de thionyle sont chauffés à reflux, au bain marie bouillant, jusqu'à l'obtention d'une solution limpide. Le chauffage est maintenu encore 30 mn, puis le chlorure de thionyle est éliminé sous pression réduite. Le chlorure d'acide solide est recristallisé dans benzène-hexane.

Condensation selon FRIEDEL et CRAFTS

2,1 g (0,019 mole) de résorcine, préalablement séchée au bain marie bouillant, sous pression réduite et 30 cm³ de nitrobenzène fraîchement distillé, sont chauffés légèrement, sous agitation magnétique, jusqu'à ce que le milieu soit homogène. 10 g (0,075 mole) de chlorure d'aluminium sont ajoutés rapidement, puis le chlorure d'acide dissous dans 10 cm³ de nitrobenzène est introduit lentement. Le milieu réactionnel se fluidifie et devient brun verdâtre au fur et à mesure que la réaction se poursuit. Après addition de tous les réactifs, le milieu réactionnel est chauffé pendant 6 heures au bain marie bouillant, avec agitation magnétique, puis versé sur de l'eau glacée. Un solide brun se sépare. Il est essoré, lavé abondamment avec une solution d'acide chlorhydrique dilué puis avec de l'éther pour éliminer le nitrobenzène. Il est séché à l'étuve à 100°.

La désoxybenzoïne (29) ainsi obtenue est recristallisée d'abord dans l'acide acétique à 60 %, puis dans le mélange alcool-eau (1-2).

Désoxybenzoïne (41).

Elle est préparée selon le même procédé par condensation du chlorure de l'acide phénylacétique avec la résorcine, dans les mêmes conditions expérimentales. C'est un solide blanc, purifié par recristallisations successives dans le benzène.

2-4-3 Déméthylation des désoxybenzoïnes (28) et (56) : préparation des désoxybenzoïnes (30) et (57) selon la technique utilisée par N.P. CAMPBELL et J.H. HUNT (31).

0,0065 mole de désoxybenzoïne (28) ou (56), est chauffée à reflux, au bain d'huile pendant 5 heures, dans 25 cm³ d'acide acétique concentré et 25 cm³ d'acide bromhydrique à 48 %. Après refroidissement à température ambiante, le

milieu brun limpide est versé sur 50 cm³ d'eau glacée. Le précipité de désoxybenzoïne déméthylée obtenu est essoré, lavé à l'eau et à l'éther, séché et recristallisé.

Pour la désoxybenzoïne (57), la recristallisation ne constitue pas une purification suffisante. Le produit brut est dissous en milieu alcalin à pH 9,5. La désoxybenzoïne (56) de départ, insoluble à ce pH, est éliminée par filtration. Le filtrat limpide est ajusté à pH 3 avec de l'acide chlorhydrique dilué. La désoxybenzoïne (57) se sépare en cristaux jaune clair.

Ce traitement n'altère pas la fonction lactone, comme l'ont confirmé le spectre RMN d'une part et le spectre IR d'autre part. De plus, la réaction avec le réactif de Kedde est positive.

Réactif de Kedde : 1 g d'acide 3-5 dinitrobenzoïque en solution dans 100 cm³ de potasse hydro-alcoolique 2N.

Ce réactif donne une coloration pourpre à violette avec les lactones digitaliques pentacycliques α β insaturées.

2-4-4 Préparation des glucosides acétylés (31), (33), (42) et (58).

La technique utilisée est celle de KOENIGS-KNORR (108), adaptée par GROUILLER et PACHECO (110).

Modification : pour améliorer la solubilité des désoxybenzoïnes (29), (30), (41) et (57) de la pyridine anhydre a été ajoutée à la quino-
léine dans les proportions : deux quino-
léine pour une pyridine.

Les glucosides obtenus ont d'abord été cristallisés dans l'éther anhydre puis recristallisés dans l'alcool absolu.

Le rendement de la glucosylation a été nettement amélioré en utilisant un large excès d' α bromo-tétraacétyl -2,3,4,6 D-glucopyranose (3 moles pour 1 mole), la quantité d'oxyde d'argent étant fonction de la quantité d' α bromo-tétraacétyl - 2,3,4,6 D-glucopyranose.

L' α bromo-tétraacétyl -2,3,4,6 D-glucopyranose a été préparé en suivant rigoureusement le procédé de BARCZAI-MARTOS et KORÖSY (131). Il doit être conservé en le stockant au froid et à l'obscurité, sous vide dans un dessiccateur contenant de l'anhydride phosphorique et de la potasse.

L'oxyde d'argent utilisé dans la réaction de glucosylation a été obtenu par action de la potasse sur une solution aqueuse de nitrate d'argent. C'est un précipité brun qui est séché pendant 24 heures, à l'étuve, à une température inférieure à 85°.

Exemple de synthèse : préparation du monoglucoside tétraacétylé (31)

0,324 g (0,0011 mole) de désoxybenzoïne (30) est dissous dans 6 cm³ de quinquina fraîchement distillé et 4 cm³ de pyridine. A cette solution sont ajoutés 1,250 g (0,003 mole) d' α acéto-bromo glucose dissous, dans 5 cm³ de benzène anhydre, puis 0,318 g (0,00138 mole) d'oxyde d'argent.

Le mélange des réactifs est agité pendant 9 heures à température ambiante puis les sels d'argent colloïdaux sont séparés de la phase benzénique par filtration lavés avec du benzène anhydre.

Les phases benzéniques réunies sont lavées avec 3 fois 30 cm³ d'acide sulfurique glacé à 10 %, puis à l'eau et séchées sur sulfate de magnésium.

Lors du lavage avec la solution d'acide sulfurique dilué, il apparaît encore un abondant précipité de sels colloïdaux : ce précipité est essoré, lavé au benzène et le benzène est réuni aux phases organiques précédentes pour la suite des lavages.

Après évaporation du benzène, l'huile résiduelle est reprise avec l'éther anhydre : le monoglucoside tétraacétylé cristallise lentement sous forme d'une poudre fine, orangée.

Ce précipité est essoré et recristallisé dans l'alcool absolu. Après 3 recristallisations successives, le produit obtenu donne un seul spot en chromatographie en couche mince sur silicagel G dans le solvant butanol-acide acétique - eau (4-1-5) et son analyse élémentaire est satisfaisante.

2-4-5 Désacétylation : préparation des glucosides (32), (34), (43) et (59)

La technique utilisée est celle de FUJISE et MITUI (109), largement appliquée par GROUILLER et PACHECO (110).

Modification :

L'acétate de sodium formé au cours de la réaction est éliminé par lavage du produit brut à l'eau glacée lorsque le glucoside obtenu est suffisamment insoluble dans l'eau à 0°.

Pour le triglucoside (34) très soluble dans l'eau froide, l'acétate de sodium a été éliminé par passage sur résine échangeuse de cations : Dowex x 50.

Exemple de synthèse : préparation du monoglucoside (32)

A la solution de 0,250 g (0,0004 mole) de monoglucoside tétra-acétylé (31) dans 5 cm³ de chloroforme et 2,5 cm³ de méthanol, redroïdie à 0° sont ajoutés goutte à goutte, 3,25 cm³ (0,0016 mole) de solution de soude à 2 % dans le méthanol.

L'agitation est maintenue pendant 30 minutes à 0° puis la solution est neutralisée par de l'acide acétique à 20 % (pH 5). Après addition de quelques cm³ d'eau, la solution neutralisée est évaporée à sec. Le résidu visqueux est repris par de l'eau glacée : un précipité orangé apparaît progressivement.

Il est essoré, lavé à nouveau avec de l'eau glacée, séché au dessiccateur puis recristallisé dans l'éthanol à 95°.

Dosage du glucose pour les glucosides (32), (34) et (59)

Il a été effectué suivant la technique de SCHAFFER et HARTMAN (115) sur la solution obtenue après hydrolyse des glucosides par chauffage pendant 2 heures dans l'acide chlorhydrique à 5 %, élimination de l'aglycone par filtration et neutralisation de la solution.

Pourcentage de glucose libéré :

Glucoside (<u>34</u>)	Glucoside (<u>59</u>)
calculé : % $\pm$ 38 avec un glucose	calculé % : 37 avec un glucose
57 avec deux glucoses	56 avec deux glucoses
67,5 avec trois glucoses	
trouvé % : 66,2	trouvé % : 54

Pour le glucoside (32), le glucose a été dosé par chromatographie sur papier.

Le glucoside (43) a été identifié par comparaison de ses caractéristiques physiques avec celles obtenues par ZEMPLÉN et FARKAS (113) d'une part, La présence d'un seul glucose dans la molécule a été confirmée par le spectre RMN du glucoside acétylé (42) d'autre part.

2-4-6 Pouvoir rotatoire des glucosides acétylés et des glucosides désacétylés synthétisés

Monoglucoside tétraacétylé (<u>31</u>) $[\alpha]_D^{24^\circ}$	$= -136 \pm 8^\circ$ (c = 0,5 acétone)
Monoglucoside désacétylé (<u>32</u>) $[\alpha]_D^{24^\circ}$	$= -60 \pm 12^\circ$ (c= 0,5/3 alcool-eau 1-2)
Triglucoside acétylé (<u>33</u>) $[\alpha]_D^{24^\circ}$	$= -120 \pm 40^\circ$ (c=0,05 acétone)
Triglucoside désacétylé (<u>34</u>) $[\alpha]_D^{24^\circ}$	$= -150 \pm 30^\circ$ (c= 0,2/3 alcool-eau 1-17)
Diglucoside acétylé (<u>58</u>) $[\alpha]_D^{24^\circ}$	$= -69 \pm 30^\circ$ (c= 0,029 acétone)
Diglucoside désacétylé (<u>59</u>) $[\alpha]_D^{24^\circ}$	$= -96 \pm 24^\circ$ (c= 0,25/3 alcool-eau 1-2,5)
Monoglucoside acétylé (<u>42</u>) $[\alpha]_D^{24^\circ}$	$= -37 \pm 15^\circ$ (c= 0,64 acétone)
Monoglucoside désacétylé (<u>43</u>) $[\alpha]_D^{24^\circ}$	$= -55 \pm 16^\circ$ (c= 0,62 alcool-eau 2-3)

(42) $[\alpha]_D^{24^\circ} = -37 \pm 15^\circ$ (c=0,64 acétone)

Remarque : pour les glucosides acétylés (33) et (35), les solutions dans l'acétone sont très colorées. Nous avons dû effectuer des dilutions importantes, d'où l'imprécision des mesures.

2-4-7 Préparation des triacétates de désoxybenzoïne (35) et (44).

0,0015 mole de désoxybenzoïne (29) ou (41) est chauffée à reflux, au bain d'huile, avec 3 cm³ d'anhydride acétique et 0,3 cm³ de pyridine anhydre pendant 5 heures. Le milieu réactionnel est ensuite versé sur de la glace. le précipité est essoré, lavé à l'eau et recristallisé.

Une petite fraction de désoxybenzoïne (35) est hydrolysée par chauffage dans l'alcool absolu, en présence d'acide chlorhydrique (solution 2 N), pendant 3 heures. Le produit brut est recristallisé dans le mélange alcool-eau après évaporation à sec du milieu réactionnel. Il est identique à la désoxybenzoïne de départ (29) : F = 250°.

Tableau V

N°	Formules brutes	M	Solvants de reconst.	F°	Eb. °	Rdt %	Analyses				Bibliographie	
							Calc. %		Tr. %		Rdt. %	F°
							C	H	C	H		
<u>22</u>	C ₁₁ H ₁₁ O ₃ Cl	226,5	EtOH abs. Ether	65	145/0,05	29	58,28	4,86	58,32	4,78	25	65
<u>24</u>	C ₁₃ H ₁₄ O ₅	250			168/0,2	72					95	
<u>26</u>	C ₁₃ H ₁₂ O ₄	232	EtOH abs.	127	165/0,05	31	67,24	5,13	67,31	5,13	29	127
<u>27</u>	C ₁₂ H ₁₀ O ₄	218	Ac. Acétique	224		85	66,04	4,61	65,96	4,63	79	220-22
<u>28</u>	C ₁₉ H ₁₆ O ₄	308	Ac. Acétique	206		50	74,01	5,23	73,91	5,41	42	200
<u>29</u>	C ₁₈ H ₁₄ O ₅ , 1/2H ₂ O	319	Ac. Acétique 60%	250		50	67,71	4,70	68,14	4,57	Corps nouveau	
<u>30</u>	C ₁₈ H ₁₄ O ₄	294	EtOH abs.	246		47	73,47	4,76	73,46	4,87	Corps nouveau	
<u>31</u>	C ₃₂ H ₃₂ O ₁₃	624	EtOH abs.	138- 140		70	61,53	5,12	61,29	5,19	Corps nouveau	
<u>32</u>	C ₂₄ H ₂₄ O ₉ , 2 H ₂ O	492	EtOH 95°	220- 225		65	58,54	5,60	58,54	5,42	Corps nouveau	

Tableau VI.

[illegible]

Tableau VII

N°	Formules brutes	M	Solvants de recrist.	F°	Eb. °	Rdt%	Analyses				Bibliographie
							Calc. %		Tr. %		
							C	H	C	H	
<u>49</u>	C ₁₅ H ₁₈ O ₅	278			165/0,2	85	64,75	6,50	64,55	6,62	Corps nouveau
<u>50</u>											
<u>53</u>	C ₁₅ H ₁₆ O ₄	260	Ether-EtOH abs.	112	155-170 / 0,2	30	69,23	6,15	69,25	6,06	Corps nouveau
<u>55</u>	C ₁₄ H ₁₄ O ₄	246	Ac. Acét. 60% Eau	150		89	68,29	5,69	68,46	5,73	Corps nouveau
<u>56</u>	C ₂₁ H ₂₀ O ₄	336				90	75,00	5,95	74,84	6,15	Corps nouveau
<u>57</u>	C ₂₀ H ₁₈ O ₄ , 1/2 H ₂ O	322	EtOH 95° Eau	128		40	72,50	5,74	72,49	5,83	Corps nouveau
<u>58</u>	C ₄₈ H ₅₄ O ₂₂	982	EtOH abs.	138- 140		70	58,65	5,50	58,93	5,42	Corps nouveau
<u>59</u>	C ₃₂ H ₃₈ O ₁₄ , H ₂ O	664	EtOH 95°	200- 205		60	57,8	6,0	57,3	5,51	Corps nouveau

3. SYNTHESE D'UN GLUCOSIDE DE FLAVONE LACTONIQUE.

PLAN

====

3-1 Introduction

3-2 Principe des synthèses chimiques réalisées

3-3 Principales caractéristiques spectrales et chromatographiques
des dérivés synthétisés

3-4 Partie expérimentale.

3-1 INTRODUCTION

Pour accéder à des analogues de cardénolides, composés qui doivent obligatoirement comporter une fonction lactone et un résidu sucre, nous avons vu que deux démarches étaient également possibles. Après avoir synthétisé les glucosides de désoxybenzoïnes pour lesquels nous avons d'abord élaboré la fonction lactone, puis construit le squelette carboné, nous avons cherché dans un deuxième temps à construire tout d'abord le squelette carboné analogue au squelette cholanique des glucosides stéroliques cardiotoniques naturels puis à greffer dans les dernières étapes de la synthèse le cycle buténolide α β insaturé. En effet, ayant choisi le squelette flavonique comme squelette de base, le noyau lactonique paraissait ne pas pouvoir résister quel que soit le procédé de synthèse retenu pour la flavone.

Nous avons choisi alors le squelette flavonique comme squelette de base pour diverses raisons.

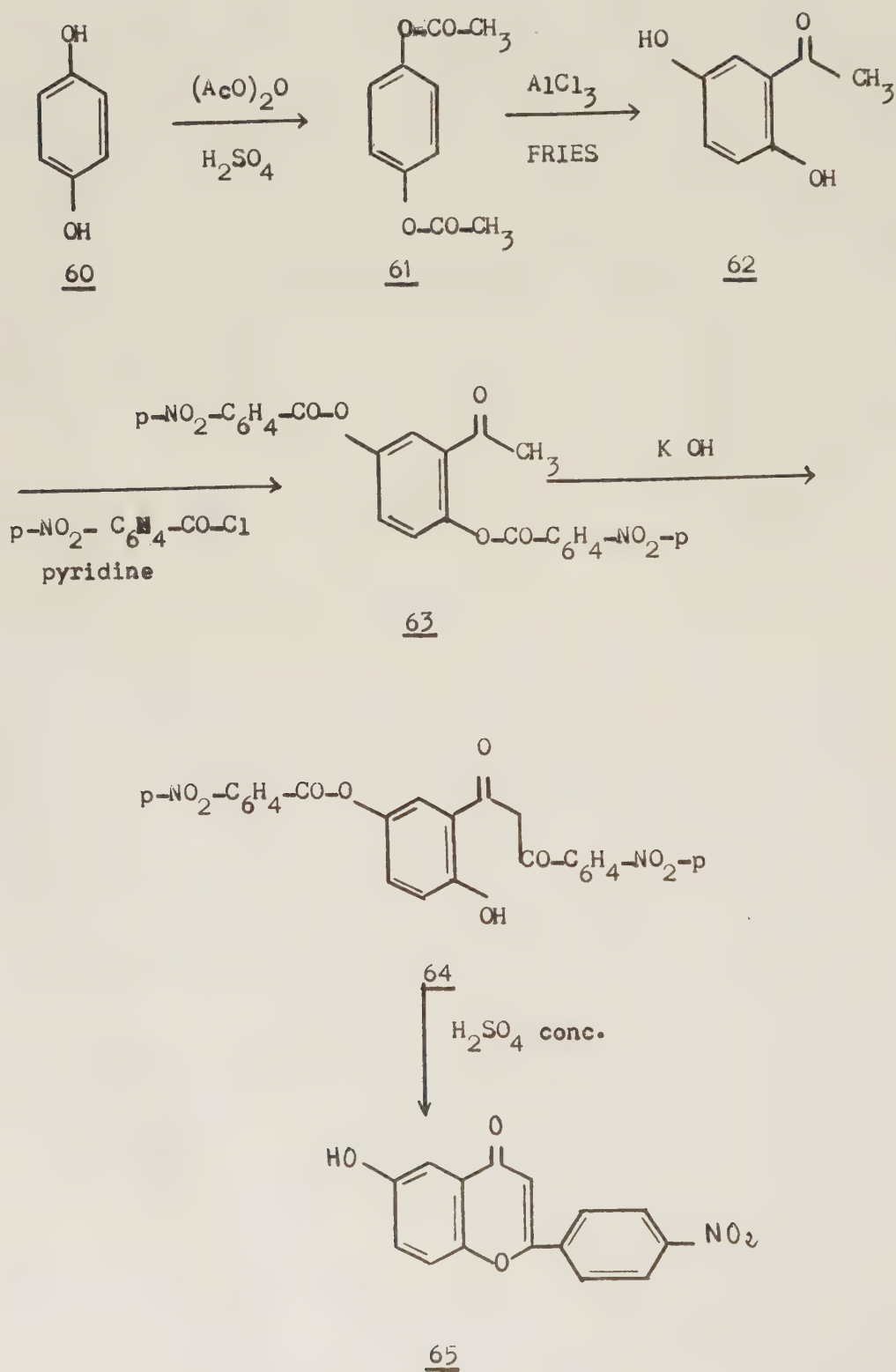
Tout d'abord, le squelette carboné de base des composés flavoniques, en C_{15} , présente l'enchaînement $C_6 - C_3 - C_6$ (Fig. 12). Par ses dimensions moléculaires, ce squelette flavonique peut être rapproché de celui des stérols. Il faut cependant faire une restriction en ce qui concerne la stéréochimie. En effet, pour les génines cardiotoniques naturelles, la molécule du fait de la configuration cis des cycles A, ^{et} B présente dans l'espace une courbure assez marquée, alors que le squelette carboné des flavones est plan et figé.

D'autre part l'élaboration du squelette flavone nous a semblé, au premier abord relativement aisée car la chimie des composés flavoniques s'est considérablement développée durant les dernières décades.

Enfin, les flavonoïdes en général présentent un intérêt pharmacodynamique certain, la plupart d'entre eux étant doués de propriétés diurétiques, anti-spasmodiques, tonicardiaques et hypertensives, vitaminiques P. Notons enfin que certaines isoflavones comme le génistéol, présentent une activité oestrogène importante.

Une fois le squelette flavonique choisi comme squelette de base, il s'est agi alors de déterminer quels substituants nous allions introduire et dans quelles positions de façon à pouvoir élaborer la fonction lactone d'une

Figure 17



part et greffer le sucre d'autre part. Pour que l'analogie avec les cardénolides naturels soit respectée, la présence de substituants en 6 et 4' s'est avérée nécessaire :

- en 6, un groupement hydroxyle permettant une glucosylation sélective dans la dernière étape
- en 4', un groupement tel qu'il permette l'élaboration du cycle buténolide.

Dès 1941, ELDERFIELD et ses collaborateurs qui ont beaucoup étudié la chimie des cardénolides naturels et plus particulièrement de leurs génines, ont mis au point un certain nombre de méthodes de synthèse du cycle buténolide α β insaturé et substitué en β (24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 116, 117, 118). Nous avons retenu la méthode qui utilisait comme matière première de départ une ω acétoxy-méthyl-cétone (117). En effet cette méthode semblait donner les meilleurs rendements d'une part et d'autre part c'est celle qui a été le plus largement utilisée par la suite dans les synthèses partielles de cardénolides analogues aux produits naturels (24 à 30, 116 à 118).

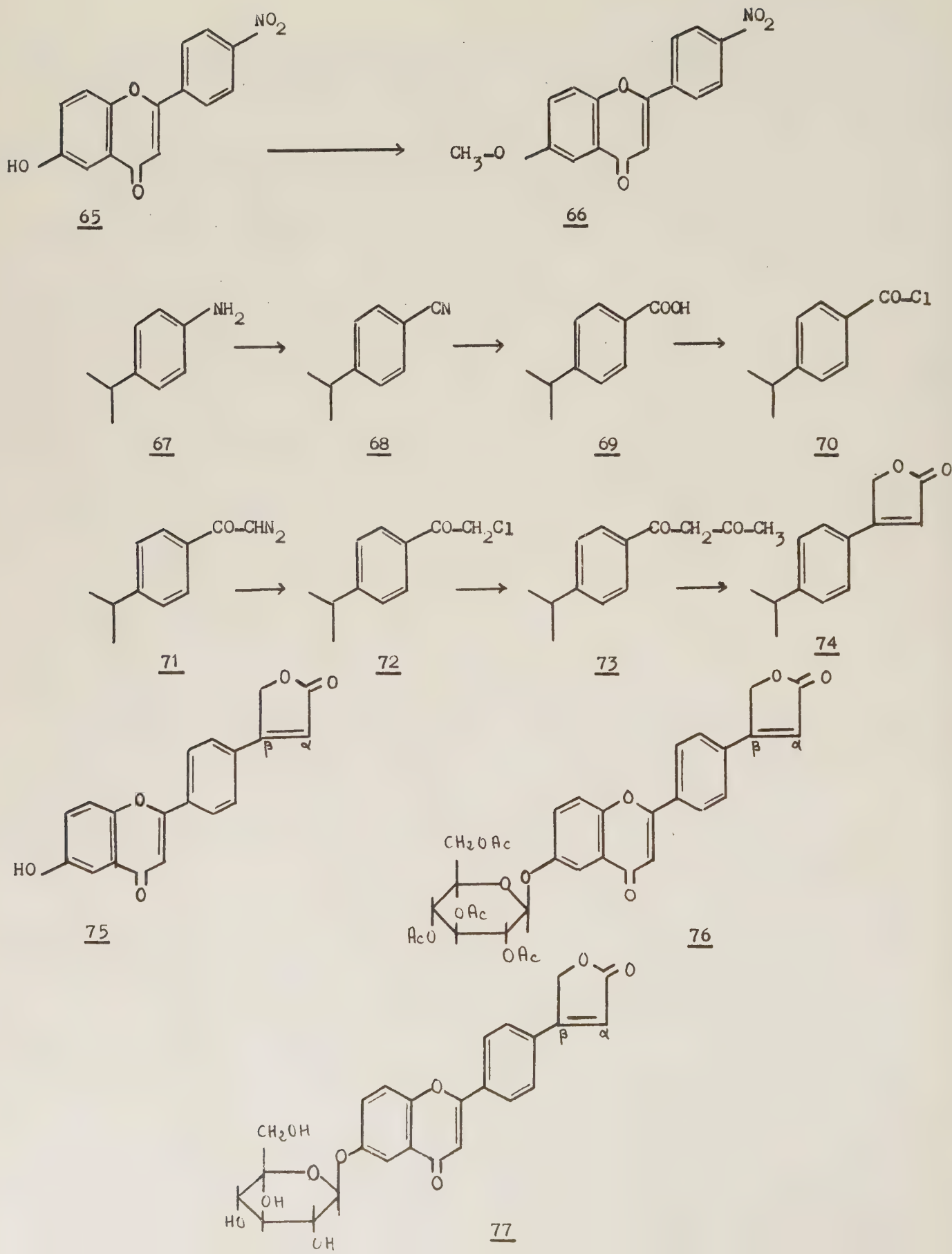
En fonction de ce choix, nous avons décidé d'introduire en 4' un groupement nitro. En effet, lorsque CAMPHBELLE et HUNT (31) synthétisèrent des buténolides phénoliques analogues d'oestrogènes synthétiques, ils construisirent progressivement la fonction lactone sur un squelette phénolique à partir du groupement nitro, par une suite de réactions classiques de chimie organique. Nous avons choisi de reprendre cette voie de synthèse car elle nous a semblé le seul moyen valable de greffer, sur le phényle latéral de la flavone, le groupement "acétoxy-méthyl-cétone" indispensable à la formation du cycle buténolide α β insaturé.

Cette méthode de synthèse présente l'inconvénient majeur d'être laborieuse, le passage du groupement nitro au groupement acétoxy-méthyl-cétone comportant 8 étapes, cependant elle nous a semblé être la plus sélective et la moins traumatisante pour le squelette flavonique.

La synthèse de la glucosyloxy-6, (buténolide β , Δ α - β)-4' flavone peut donc se résumer en quatre étapes principales :

- synthèse de l'hydroxy-6 nitro 4' flavone
- synthèse de la méthoxy-6 acétoxy-acétyl- 4' flavone
- Synthèse de l'hydroxy-6 (buténolide β , Δ - α β)- 4' flavone
- Synthèse de la glucosyloxy-6 (buténolide β , Δ α - β)- 4' flavone

Figure 18



3-2 PRINCIPE DES SYNTHÈSES CHIMIQUES RÉALISÉES

3-2-1 Synthèse de 1'hydroxy-6 nitro-4' flavone (65) (Figure 17)

Nous avons pensé, dans un premier temps, accéder rapidement à 1'hydroxy-6 nitro-4' flavone, par condensation de la dihydroxy-2,5 acétophénone (67) avec 1'anhydride de 1'acide p. nitro benzoïque, en présence du sel de potassium de cet acide selon la technique de ALLAN et ROBINSON (119). Or cette technique peut difficilement s'appliquer à des dérivés nitrés. En effet, elle implique le chauffage à très haute température, en phase solide hétérogène de 1'anhydride p. nitro benzoïque d'où les risques, non négligeables d'explosion. D'autre part, la condensation d'ALLAN et ROBINSON donne très souvent des mélanges de produits avec un rendement assez médiocre.

C'est pourquoi, nous avons cherché une autre voie de synthèse, en nous inspirant de la méthode utilisée par J. GOWAN et T.S. WHEELER (120) pour la préparation de 1'hydroxy-7 nitro 4' flavone, qui fait appel à la transformation de BAKER VENKATARAMAN.

La matière première de départ utilisée, pour la synthèse de 1'hydroxy-6 nitro-4' flavone est le diacétate d'hydroquinone (61), préparé par acétylation de 1'hydroquinone (60) (121). Cette réaction classique d'acétylation d'un phénol en milieu acide fournit le diacétate d'hydroquinone (61) rapidement, à froid et avec un très bon rendement.

Par une transposition de FRIES, en présence de chlorure d'aluminium, le diacétate d'hydroquinone (61) conduit à la dihydroxy-2,5 acétophénone (62) (122).

Après estérification par le chlorure de 1'acide p. nitro benzoïque des deux groupements hydroxyles libres de la dihydroxy-2,5 acétophénone (62), la p.-nitro-benzoyloxy-2,5 acétophénone (63) ainsi obtenue est soumise à une transposition dite de BAKER-VENKATARAMAN, en présence de pyridine et de potasse (123) (124). Le nitro-4' hydroxy-2 p-nitro-benzoyloxy-4 dibenzoyl méthane (64) plus couramment appelé dicétone est obtenu avec un bon rendement, mais, nous avons rencontré à ce stade des problèmes de purification d'une part et de mise au point des conditions expérimentales d'autre part. En effet, les conditions

décrites dans la littérature sont valables pour des quantités de réactifs de l'ordre de la millimole ; elles ne sont plus du tout satisfaisantes lorsqu'on opère sur des plus grosses quantités de l'ordre de 1 ou 0,1 mole.

Enfin l'hydroxy-6 nitro-4' flavone (65) libre est obtenue par cyclisation de la dicétone en milieu sulfurique concentré, à froid. En effet, l'hydrolyse du groupement p. nitro benzoxyloxy en 6 se produit en même temps que la cyclisation, dans les mêmes conditions. Il s'est agi alors de séparer l'acide p. nitro benzoïque obtenu par hydrolyse et la flavone libre ainsi formée. Après de nombreuses tentatives, la solution la meilleure retenue, a été l'ébullition prolongée avec de l'eau. En effet, les composés flavoniques en général et plus particulièrement l'hydroxy-6 nitro-4' flavone sont très insolubles dans l'eau, même à chaud, tandis que l'acide p. nitro benzoïque est relativement soluble.

3-2-2 Synthèse de la méthoxy-6 acétoxy-acétyl-4' flavone (73) (Figure 18)

A ce stade de la synthèse, notre but était de passer du groupement NO_2 en 4' au groupement acétoxy-acétyl. Or ce passage, impliquait dans une première étape, la réduction du groupement nitro NO_2 en groupement amino NH_2 par le chlorure stanneux en milieu chlorhydrique concentré. Nous avons pensé alors qu'il était préférable de bloquer le groupement hydroxyle libre en 6 pour éviter des réactions secondaires. Nous avons choisi le groupement protecteur méthoxyle car nous avions acquis dans la première partie de notre travail, l'expérience des déméthylations, et parce que le cycle lactonique résiste à l'action de BrH , nécessaire à la déméthylation. En effet, il était nécessaire de pouvoir libérer facilement le groupement hydroxyle en 6, en fin de synthèse pour réaliser la glucosylation.

Dans un premier temps nous avons donc méthylé l'hydroxy-6 nitro-4' flavone (65) par la méthode classique à l'aide du sulfate de méthyle en présence de carbonate de potassium. Notons que, cette méthoxy-6 nitro-4' flavone (66) avait déjà été préparée, antérieurement par d'autres auteurs (125) selon une technique différente et avec un très mauvais rendement de l'ordre de 18 % à 23%.

La réduction, de la méthoxy-6 nitro-4' flavone (66) en méthoxy-6 amino-4' flavone (67) est réalisée par le chlorure stanneux en milieu chlorhydrique concentré. La flavone est obtenue sous forme d'amine libre avec un très bon rendement.

Le passage de la fonction amine en 4' à la fonction nitrile se fait par l'intermédiaire du sel de diazonium de l'amine libre en présence de cyanure cuivreux dans une réaction de SANDMEYER. Ce type de réaction a été utilisé notamment par BIGGERSTAFF et WILDS (126) pour la synthèse de l'acide α (p. cyanophényl) butyrique, intermédiaire dans la synthèse des buténolides analogues d'oestrogènes de CAMPBELL et HUNT.

La méthoxy-6 cyano-4' flavone (68) est ensuite hydrolysée, de façon à obtenir la fonction acide libre, en méthoxy-6 carboxy-4' flavone (69). L'hydrolyse de la fonction nitrile en fonction acide a d'abord été tentée en milieu alcalin mais c'est l'hydrolyse acide qui a donné les meilleurs résultats.

A partir de cet acide, il s'est agi alors, d'allonger la chaîne carbonée en 4' de façon à amorcer l'ébauche de la fonction lactone. Nous avons fait appel à une réaction classique, celle de ARNDT et EISTERT (127). Par action, du diazométhane sur un chlorure d'acide, cette réaction permet de passer à la diazocétone correspondante. Nous avons donc synthétisé selon cette méthode la méthoxy-6 diazoacétyl-4' flavone (71). Cette étape délicate a nécessité une mise au point assez longue, l'obstacle majeur étant la faible solubilité du chlorure d'acide (70) dans les solvants organiques usuels.

Nous pensions passer directement de la méthoxy-6 diazoacétyl-4' flavone (71) à la méthoxy-6 acétoxy-acétyl 4' flavone (73) par ébullition avec de l'acide acétique concentré. Cette réaction, notée pour la première fois par BRADLEY et ROBINSON (128), développée par ARNDT et EISTERT (127) a été utilisée par STEIGER et REICHSTEIN (129) pour la synthèse de la désoxycorticostérone, puis couramment utilisée pour des synthèses partielles de cardénolides. En fait, nous n'avons pas pu obtenir directement cette acétoxy-méthyl-cétone avec un rendement convenable et il a été nécessaire de passer par la chlœrocétone intermédiaire.

La méthoxy-6 diazoacétyl-4' flavone (71) traitée par l'acide chlorhydrique gazeux conduit à la méthoxy-6 chloroacétyl-4' flavone (72) qui donne, alors, en présence d'anhydride acétique et d'acétate de sodium, la méthoxy-6 acétoxy-acétyl-4' flavone (73) attendue.

3-2-3 Synthèse de l'hydroxy-6 (buténolide $\beta, \Delta \alpha-\beta$)-4' flavone (75)
(Figure 18)

La formation du cycle buténolide $\alpha \beta$ insaturé a été l'étape la plus délicate de toute la synthèse. Nous avons fait appel à la réaction de REFORMATSKY c'est à dire à l'action du bromacétate d'éthyle sur une cétone (cétone du groupement acétoxy-acétyl en 4') en présence de zinc finement divisé. Cette méthode nous avait donné de bons résultats pour la synthèse du cycle buténolide des désoxybenzoïnes dans la première partie de notre travail, mais la molécule que nous avons soumise alors à l'action du bromacétate d'éthyle et du zinc était beaucoup moins élaborée, donc moins fragile.

La réaction de REFORMATSKY a déjà été utilisée antérieurement dans des cas très complexes de synthèse partielle de cardénolides par ELDERFIELD et ses collaborateurs. Ces auteurs ont préparé ainsi, par exemple, la désoxy-14 thévétigénine et la bidésoxy-3,14 thévétigénine (116) à partir des acides hydroxy-3 β éthiocholanique et éthiocholanique et le norcholanyl $\beta\beta$ buténolide $\Delta\alpha\beta$ (117). Les conditions opératoires et les produits obtenus au cours de la réaction varient avec chaque cas particulier. D'une façon générale, la réaction de REFORMATSKY fournit un mélange du buténolide $\alpha\beta$ insaturé désiré et de la lactone saturée et hydroxylée en β de la fonction carbonyle qu'il convient de traiter en milieu acide suivant des modalités adaptées, à chaque cas particulier, pour obtenir le buténolide $\alpha\beta$ insaturé.

Notre cas particulier, présentait un problème supplémentaire car la méthoxy-6 acétoxy-acétyl-4' flavone (73) comporte deux fonctions carbonyle. Cependant il est bien connu que le groupement carbonyle des composés

flavoniques ne présente pas les propriétés classiques des cétones aliphatiques ou aromatiques, et en particulier ne réagit pas avec les réactifs de GRIGNARD. Il était donc logique de penser que le carbonyle de la flavone ne réagirait pas non plus avec le bromacétate d'éthyle et le zinc dans la réaction de REFORMATSKY, ce qui fut confirmé par nos expériences.

Nous avons synthétisé la méthoxy-6 (buténolide $\beta, \Delta \alpha-\beta$)-4' flavone (74) en deux étapes. Dans un premier temps, nous avons soumis la méthoxy-6 acétoxy-acétyl-4' flavone à l'action du zinc et du bromacétate d'éthyle dans des conditions opératoires bien déterminées, puis, dans un second temps, nous avons traité le produit brut de la réaction précédente, par le mélange acide acétique-acide chlorhydrique concentrés à l'ébullition pendant 1 heure. Cette méthode nous a permis d'obtenir presque exclusivement la lactone $\alpha \beta$ insaturée que nous attendions, en 4' de la flavone.

La déméthylation de la flavone (74) en hydroxy-6 (buténolide $\beta, \Delta \alpha \beta$)-4' flavone (75) a été réalisée selon le même procédé que nous avons utilisé pour la déméthylation des désoxy-benzoïnes dans la première partie de notre travail. Il nous a donné aussi d'excellents résultats dans cette série flavonique.

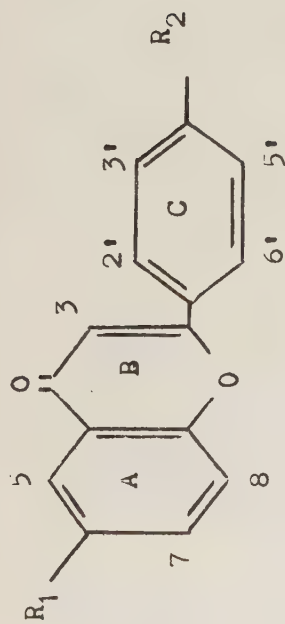
3-2-4 Synthèse de la glucosyloxy-6 (buténolide $\beta, \Delta \alpha-\beta$)-4' flavone (77) (Figure 18)

Comme pour la déméthylation, nous avons employé pour la glucosylation les mêmes techniques que celles utilisées avec succès pour la synthèse des glucosides de désoxybenzoïnes.

Nous avons obtenu de la même façon le glucoside tétraacétylé (76) de la flavone, avec cependant, un rendement assez faible. Il aurait été certainement possible d'améliorer ce rendement en ajustant les conditions expérimentales au cas particulier de la flavone, mais nous avons été limité par le temps. Par contre, la désacétylation du glucoside tétraacétylé, a fourni la glucosyloxy-6 (buténolide $\beta, \Delta \alpha \beta$)-4' flavone, avec un rendement correct, au terme de la dix-septième étape.

Dans cette deuxième partie de notre travail, la synthèse de la glucosyloxy-6 (buténolide $\beta, \Delta \alpha \beta$)-4' flavone (77) que nous avons réalisée, est une

Tableau VIII - Spectres RMN des composés flavoniques synthétisés



N°	R ₁	R ₂	noyau B: H-3	noyau A	noyau C	O-CH ₃	acétoxyle
<u>65</u>	OH	NO ₂	7,12	H-5 7,58 H-7,8 7,32	H-2',6' 8,35 H-3',5'		
<u>66</u>	OCH ₃	NO ₂	7,11	H-5 7,64 H-7,8 7,41	H-2',6' 8,30 H-3',5'	3,87	
<u>67</u>	OCH ₃	NH ₂	6,73	H-5 6,82 H-7,8 6,75	H-2',6' 7,83 H-3',5' 7,51	3,87	
<u>68</u>	OCH ₃	CN	7,02	H-5 7,54 H-7,8 7,40	H-2',6' 8,12 H-3',5' 7,92	3,88	
<u>69</u>	OCH ₃	COOH	6,98	H-5 7,58 H-7,8 7,32	H-2',6' 8,03 H-3',5'	3,80	
<u>72</u>	OCH ₃	CO-CH ₂ Cl	7,09	H-5 7,52 H-7,8 7,41	H-2',6' 8,02 H-3',5'	3,87	
<u>73</u>	OCH ₃	CO-CH ₂ -O-COCH ₃	6,80	H-5 7,52 H-7,8 7,32	H-2',6' 7,98 H-3',5'	3,88	2,22

synthèse de longue haleine, pour laquelle, nous n'avons pas rencontré les mêmes types de difficultés que dans la série des désoxybenzoïnes. En effet, dans la première partie de notre travail, nous avons eu surtout à résoudre des problèmes de structure : détermination de structure du triacétate (35), du triglucoside (34), du diglucoside (59). Dans la série flavonique, la difficulté principale a été le nombre des étapes, c'est pourquoi nous nous sommes attachés tout particulièrement à améliorer le rendement de chaque étape et la purification des dérivés intermédiaires. Nous n'avons pas rencontré d'importants problèmes de détermination de structure, si ce n'est pour le passage de la diazocétone à l'acétoxy-méthyl cétone que nous n'avons pu réaliser directement, et pour lequel nous avons dû faire appel à la chloracétone intermédiaire.

3-3 PRINCIPALES CARACTERISTIQUES SPECTRALES ET CHROMATOGRAPHIQUES DES DERIVES SYNTHETISES

L'analyse des spectres RMN, Infra-Rouge et Ultra-Violet nous a permis de confirmer la structure des produits préparés ; la chromatographie en couche mince sur Silica gel G nous a permis de vérifier leur pureté.

3-3-1 Spectres RMN (Tableau VIII)

Les mesures ont été faites avec un appareil VARIAN A 60, les différentes substances étant dissoutes dans le diméthylsulfoxyde (DMSO). Les déplacements chimiques sont exprimés en p. p. m. par rapport au triméthylsilane comme référence interne (zéro).

Les résultats sont consignés dans le tableau VIII. Nous avons effectué les spectres des dérivés flavoniques non lactoniques uniquement, car nous avons été limités par la faible solubilité des produits dans les solvants usuels pour la RMN, y compris le DMSO.

Lorsque nous comparons les spectres des méthoxy-6 flavones, diversement substituées en 4', nous constatons que, quel que soit le substituant introduit en 4', le déplacement chimique des protons de la flavone n'est pas beaucoup modifié, dans son ensemble. Le déplacement chimique du proton H-3 varie, cependant, en fonction du pouvoir électro-attracteur ou électro-donneur des substituants en 4'.

Notons aussi que le spectre RMN des flavons substituées en 6 et en 4' est assez nettement décàlé vers les champs élevés, par rapport aux autres flavones.

3-3-2 Spectres Infra-Rouge (Tableau IX)

Les mesures ont été faites avec un appareil PERKIN-ELMER, en phase solide : pastillage dans KBr.

Tableau IX - Spectres Infra- Rouge.

<u>65</u>	:	hydroxy-6 nitro-4' flavone	CO flavone :	1640 cm ⁻¹					
<u>72</u>	:	méthoxy-6 chloracétyl-4' flavone	CO flavone :	1642 cm ⁻¹	CO-CH ₂ -Cl :	1710 cm ⁻¹			
<u>73</u>	:	méthoxy-6 acétoxyacétyl-4' flavone	CO flavone :	1638 cm ⁻¹	CO-CH ₂ - :	1710 cm ⁻¹	acétate :	1755 cm ⁻¹	
<u>74</u>	:	méthoxy-6 buténolide-4' flavone	CO flavone :	1638 cm ⁻¹	lactone :	1740 cm ⁻¹			
						1785 cm ⁻¹			
<u>75</u>	:	hydroxy-6 buténolide-4' flavone	CO flavone :	1640 cm ⁻¹	lactone :	1740 cm ⁻¹			
						1790 cm ⁻¹			
<u>76</u>	:	acétylglucosyloxy-6 but.4' flavone	CO flavone :	1640 cm ⁻¹	lactone :	1780 cm ⁻¹	bande large		
<u>77</u>	:	glucosyloxy-6 buténolide-4' flavone	CO flavone :	1638 cm ⁻¹	lactone :	1735 cm ⁻¹			
						1780 cm ⁻¹			

Les résultats sont consignés dans le tableau IX.

Nous remarquons que, quels que soient les substituants en 6 et 4', la bande caractéristique du CO de la flavone apparaît à une longueur d'onde constante qui oscille entre 1638 et 1640 cm^{-1} .

L'étude spectrale Infra-Rouge nous a permis cependant de vérifier la structure de la chloracétone 72, de l'acétoxy-méthyl-cétone 73 et surtout, de vérifier la présence de la fonction lactone pour les dérivés 74 à 77.

3-3-3 Spectres Ultra-Violet (Tableau X)

Cette étude a été réalisée avec 1mg de produit dans 100 cm^3 d'éthanol 95°. Les spectres ont été effectués avec un spectrophotomètre enregistreur BECKMAN DB-G.

Généralement les flavones présentent dans l'éthanol, une grande intensité d'absorption dans les régions de 320-380 nm (bande I) et de 240-270 nm (bande II).

Nos produits présentent les spectres caractéristiques des flavones avec néanmoins quelques petites modifications.

La bande I dont l'absorption est liée à la résonance du groupe cinnamoyle (phényle latéral), apparaît entre 300 et 310 nm, de façon constante. Cependant, lorsque le substituant en 4' est la fonction amine : NH_2 , un effet bathochrome important est observé puisque le maximum d'absorption passe à 370 nm.

La bande II dont l'absorption est liée à la résonance du groupe benzoyle (noyau chromone) apparaît entre 278 et 295 nm, alors que généralement, pour les autres flavones, elle se situe entre 240 et 270 nm.

Par conséquent, la présence d'un substituant en 6 a un effet bathochrome important, cet effet étant supérieur pour l'hydroxyle : 295 nm, que pour le méthoxyle : 280 nm, dans le cas de la flavone substituée en 4'.

Tableau X - Etude spectrale et chromatographique des composés préparés.

N°	Spectres UV : Ethanol 95°		Chromatographie en couche mince dans le solvant : Acétone-benzène 1-2 : Rf
	λ max nm	log ϵ	
<u>62</u>	220	4,42	0,70
	254	4,06	
	360	3,74	
<u>63</u>	202	4,39	0,88
	255	4,22	
<u>64</u>	202	4,60	0,01
	255	4,52	
<u>65</u>	202	4,43	0,44
	295	4,29	
	310 e	4,26	
<u>66</u>	205	4,50	0,85
	287	4,25	
	310	4,23	
<u>67</u>	202	4,21	0,43
	228	4,17	
	282	3,88	
	370	4,40	

Tableau X (suite) - Etude spectrale et chromatographique des composés préparés.

N°	Spectres UV : Ethanol 95°		Chromatographie en couche mince dans le solvant : Acétone-benzène 1-2 : Rf
	λ max nm	log ϵ	
<u>68</u>	208	4,22	0,78
	232	3,86	
	278	4,35	
	300	4,15	
<u>69</u>	204	4,41	
	278	4,32	
	307	4,27	
<u>71</u>	207	4,34	0,75
	278	4,32	
	314	4,23	
<u>72</u>	205	4,31	0,70
	280	4,23	
	309	4,16	
<u>73</u>	204	4,19	0,57
	282	4,05	
	308	3,99	

Tableau X (suite) - Etude spectrale et chromatographique des composés préparés

N°	Spectres UV : Ethanol 95°		Chromatographie en couche mince dans le solvant : Acétone-benzène 1-2 : Rf
	λ max nm	log ϵ	
<u>74</u>	205	4,55	0,86
	275	4,13	
	206	4,46	
	270	4,11	
<u>75</u>	300 inflexion	4,04	0,50
<u>76</u>	222	4,36	0,77
	268	4,26	
	310	4,28	
<u>77</u>	205	4,21	0
	270	4,11	
	305	4,07	

Révélateur des chromatographiques : - pour les dérivés 62-64-65 : chlorure ferrique en solution aqueuse à 5 %

- pour les dérivés 71-72-73 : 2-4 dinitro phénylhydrazine : 0,4% dans HCl 2N

- pour les dérivés 74 à 77 : réactif de KEDDE

- pour les autres dérivés : acide sulfurique dilué 1-1

3-4 PARTIE EXPERIMENTALE

Les principales caractéristiques physiques et les analyses élémentaires des composés nouveaux préparés sont consignées dans les tableaux XI et XII.

3-4-1 Préparation de 1'hydroxy-6 nitro-4' flavone (65) (Figure 17)

La synthèse de 1'hydroxy-6 nitro-4' flavone (65) utilise comme matière première de départ 1'hydroquinone (60). Le diacétate d'hydroquinone (61) et la dihydroxy-2,5 acétophénone (62), dérivés intermédiaires dans la synthèse de la flavone sont des composés connus (121 et 122).

Tous les dérivés suivants préparés : (63) à (77), intermédiaire dans la synthèse de la glucosyloxy-6 nitro 4' flavone (77) sont des composés nouveaux à l'exception de la méthoxy-6 nitro 4' flavone (66).

Pour la synthèse de 1'hydroxy-6 nitro-4' flavone nous nous sommes inspirés de la méthode utilisée par J. GOWAN et T.S. WHEELER (120) pour la préparation de 1'hydroxy-7 nitro-4' flavone, dans ses grandes lignes, mais nous avons dû adapter leur mode opératoire à notre cas particulier.

3-4-1-1 Préparation de la p-nitro benzoyloxy-2,5 acétophénone (63)

3 g (0,02 mole) de dihydroxy-2,5 acétophénone (62) et 9 g (0,048 mole) de chlorure de p- nitrobenzoyle sont chauffés à reflux, pendant 3 heures, au bain marie bouillant, dans 25 cm³ de pyridine.

Après retour à la température ambiante, le mélange liquide est versé dans 170 cm³ d'acide chlorhydrique à 10 %, avec refroidissement dans un bain de glace. Un abondant précipité brun apparaît aussitôt. La p- nitro benzoyloxy-2,5 acétophénone (63) ainsi obtenue est lavée avec du méthanol bouillant pour éliminer l'acétophénone de départ, puis recristallisée deux fois dans le benzène.

Le rendement en produit brut est excellent (98 %) mais il faut deux

recristallisations pour que la pureté du produit préparé soit satisfaisante.

3-4-1-2 Préparation du nitro-4' hydroxy-2 p- nitrobenzoyloxy-4 dibenzoyl méthane (64) : dicétone.

A 2 g (0,0044 mole) de p- nitrobenzoyloxy-2,5 acétophénone (63), séchée au préalable pendant 24 heures à 100°, en solution dans 20 cm³ de pyridine, sont ajoutés 1,5 g (0,026 mole) de potasse finement pulvérisée auparavant dans un mortier chaud. Le mélange est porté à 50-60°, pendant un quart d'heure, sous agitation très vigoureuse : le milieu réactionnel doit devenir progressivement visqueux.

Le précipité de sel de potassium orangé est ensuite versé dans un excès d'acide acétique à 10 %. La dicétone, jaune d'or, précipite progressivement.

Elle est recristallisée dans l'alcool absolu.

Lorsque cette préparation est réalisée avec de plus grosses quantités de réactif, il est nécessaire :

- d'assurer une agitation constante et vigoureuse.
- de contrôler la température qui ne doit jamais s'élever au dessus de 60°.
- d'utiliser une acétophénone de départ rigoureusement anhydre.

3-4-1-3 Préparation de 1'hydroxy-6 nitro-4' flavone (65) (Figure 17)

3,2 g (0,007 mole) de nitro-4' hydroxy-2 p nitrobenzoyloxy-4 dibenzoyl méthane (64) sont dissous dans 50 cm³ environ d'acide sulfurique concentré. La solution très colorée est agitée pendant 4 heures à température ambiante puis versée avec précautions dans 100 cm³ d'eau glacée. La flavone précipite sous forme de grains très ténus fortement colorés. Le précipité est essoré, lavé soigneusement avec de l'eau bouillante jusqu'à ce que l'eau de lavage ne soit plus colorée.

L'hydroxy-6 nitro-4' flavone (65) est ensuite recristallisée plusieurs fois dans l'alcool absolu : elle se présente alors sous la forme de poudre vert clair.

3-4-2 Préparation de la méthoxy-6 acétoxy-acétyl-4' flavone (73)

Pour la suite de la synthèse permettant d'accéder à la méthoxy-6 acétoxy-acétyl-4' flavone (73) à partir de la méthoxy-6 nitro-4' flavone (66) nous nous sommes inspirés de la méthode proposée par BIGGERSTAFF et WILDS (126), reprise par CAMPBELL et HUNT (31) pour la synthèse des 4-(p acétoxy phényl)-3-(p méthoxy phényl)-n-hex-3-ène et n-hexane, dérivés intermédiaires dans la synthèse des buténolides analogues du stilboestrol et de l'hexoestrol (Figure 7). En partant du principe général proposé par les auteurs nous avons adapté les conditions expérimentales à la synthèse en série flavonique.

3-4-2-1 Préparation de la méthoxy-6 nitro-4' flavone (66) (Figure 17)

Le procédé de méthylation que nous avons retenu : sulfate de méthyle et carbonate de potassium, est le plus fréquemment utilisé pour la synthèse en série flavonique.

A la solution de 4,1 g (0,015 mole) d'hydroxy-6 nitro-4' flavone (65) dans 200 cm³ d'acétone anhydre, sont ajoutés 23 cm³ (0,24 mole) de sulfate de méthyle fraîchement distillé et 39 g (0,28 mole) de carbonate de potassium préalablement séché sous vide, à 60°, pendant 2 heures.

Le mélange est chauffé à reflux pendant 24 heures. Puis la solution acétonique encore chaude, est filtrée. Le précipité minéral est lavé avec de l'acétone chaude ; les solutions acétoniques sont réunies et évaporées à sec sous vide : le résidu est cristallisé dans l'éthanol.

Après trois recristallisations successives dans l'éthanol, la méthoxy-6 nitro-4' flavone (66) ainsi obtenue, cristallisée avec une molécule d'eau, ne présente plus qu'un seul spot en chromatographie en couche

mince sur Silica Gel G, dans le solvant acétone benzène (1-2) (tableau X) et fond à 210°.

Le point de fusion donné dans la littérature est 206° pour le même dérivé, également cristallisé avec une molécule d'eau, mais préparé selon un procédé différent.

3-4-2-2 Préparation de la méthoxy-6 amino-4' flavone (67) (Figure 18)

1 g (0,003 mole) de méthoxy-6 nitro-4' flavone est chauffé à reflux avec 5 g de chlorure stanneux dans 50 cm³ d'acide chlorhydrique concentré pendant 30 minutes, avec agitation. La solution rouge vif est alors maintenue à 0° pendant quelques heures; il apparaît peu à peu un précipité rouge orangé qui est essoré et séché au dessiccateur sur potasse pour éliminer les vapeurs d'acide chlorhydrique.

Le précipité est alors dissous dans le minimum de méthanol bouillant puis une solution aqueuse d'ammoniaque (d= 0,9) est ajoutée goutte à goutte jusqu'à pH légèrement alcalin. La solution méthanolique est concentrée sous vide : la méthoxy-6 amino-4' flavone, sous forme de base libre précipite abondamment. Elle recristallise dans le mélange alcool-eau (1-1) sous forme de longues aiguilles brillantes jaune clair.

3-4-2-3 Préparation de la méthoxy-6 cyano-4' flavone (68) (Figure 18) (méthode de SANDMEYER)

Diazotation de l'amine :

A la solution, refroidie à 0°, de 2,5 g (0,009 mole) de méthoxy-6 amino-4' flavone (67) dans 50 cm³ d'acide chlorhydrique à 50 % est ajoutée lentement, sous agitation, 0,028 mole de nitrite de sodium (soit 13,2 cm³ d'une solution aqueuse à 3 g pour 20 cm³). Lorsque la quantité stoechiométrique nécessaire de solution aqueuse de nitrite de sodium a été ajoutée, il apparaît alors des fumées rousses car le nitrite de sodium qui n'est plus consommé s'hydrolyse en acide nitreux au contact de la solution acide.

Lorsque l'addition est terminée, l'agitation est maintenue pendant 30 minutes à 0° puis la solution est neutralisée avec du carbonate de sodium solide.

La solution neutralisée est alors ajoutée goutte à goutte, sous agitation, à une solution refroidie à 0° de 3,25 g (0,036 mole) de cyanure cuivreux et de 4,8 g (0,072 mole) de cyanure de potassium dans 50 cm³ d'eau.

Après addition de tous les réactifs, l'agitation est maintenue encore pendant 30 minutes à 0-5°, puis on laisse le mélange revenir à température ambiante. Le milieu réactionnel est ensuite porté à 50°, acidifié fortement et la suspension résultante est agitée à 60-70°, pendant 2 heures.

Lors de l'acidification puis du chauffage à reflux, il se forme des mousses abondantes et le milieu pâteux double rapidement de volume. Il faut donc prévoir un appareillage approprié.

Après refroidissement, la méthoxy-6 cyano-4' flavone qui a précipité, est essorée, lavée abondamment à l'eau pour éliminer les sels minéraux, puis recristallisée dans le benzène.

3-4-2-4- Préparation de la méthoxy-6 carboxy-4' flavone (69) (Figure 18)

2 g (0,0072 mole) du nitrile précédemment obtenu sont hydrolysés par chauffage à reflux, au bain d'huile à 130°, pendant 3 heures, dans le mélange acide acétique concentré : 30 cm³ - acide sulfurique concentré : 30 cm³ - eau : 30 cm³. Le mélange acide est versé dans 120 cm³ d'eau glacée. La méthoxy-6 carboxy-4' flavone (69) précipite abondamment.

Le précipité brun essoré est extrait avec 800 cm³ environ de solution aqueuse de bicarbonate de sodium à 5 %. Après élimination des résidus insolubles par filtration, la solution alcaline jaune clair est ajustée à pH 3 par addition d'acide sulfurique à 50 %. Il apparaît alors un précipité floconneux d'acide, blanc, qui est recristallisé dans l'alcool absolu.

Le rendement de cette hydrolyse est excellent puisque, après purification par le traitement au bicarbonate de sodium et recristallisation, il est encore de 92 %.

Outre l'étude spectrale et chromatographique et l'analyse élémentaire, la pureté du produit préparé a été contrôlée par dosage de la fonction acide avec une solution de soude N/10, en présence de phénolphthaleine comme indicateur coloré.

Masse Molaire théorique du dérivé (69) :	296
Masse Molaire trouvée par dosage :	291 ± 10

3-4-2-5 Préparation de la méthoxy-6 diazoacétyl-4' flavone (71) (Figure 18)

Chlorure de l'acide (69) :

2,7 g (0,009 mole) de méthoxy-6 carboxy-4' flavone (69) sont chauffés à reflux pendant 2 heures avec 20 cm³ de chlorure de thionyle fraîchement distillé et 2 gouttes de pyridine, puis le chlorure de thionyle en excès est évaporé. Le résidu solide est repris deux fois par 5 cm³ de benzène anhydre, et le benzène est évaporé pour éliminer les dernières traces de chlorure de thionyle.

Le chlorure d'acide (70) ainsi préparé est un solide jaune orangé qui recristallise dans le mélange benzène-hexane (1-2). F = 140°.

Diazométhane : CH₂ N₂.

Il est préparé en solution étherée exempte d'alcool, par hydrolyse alcaline du N-nitroso p- toluène sulfonamide (130).

La teneur en diazométhane de la solution étherée est contrôlée par dosage en retour avec une solution de soude N/10, d'une solution d'acide benzoïque contenant 2 cm³ de la solution étherée de CH₂ N₂ à doser.

Méthoxy-6 diazoacétyl-4' flavone (71).

Le chlorure d'acide (70) étant très insoluble dans l'éther et le tétra-hydrofurane anhydres, solvants usuels des réactions de ARNDT et EISTERT (127), nous avons dû choisir le benzène anhydre comme solvant de réaction bien que la solubilité du dérivé (70) ne soit pas encore satisfaisante.

0,009 mole du chlorure d'acide (70) est dissoute dans le minimum de benzène anhydre chaud (250 à 300 cm³). Après refroidissement, la solution benzénique est ajoutée goutte à goutte, sous agitation, à une solution étherée de 0,022 mole de diazométhane, refroidie à 0°. Le mélange est maintenu encore pendant 30 minutes entre + 5 et 0° puis ramené progressivement à température ambiante.

Après 24 heures sous agitation à température ambiante, l'éther et le benzène sont évaporés. Le solide cristallin résiduel est recristallisé dans benzène-hexane (1-2).

La méthoxy-6 diazoacétyl-4' flavone (71) peut, sans inconvénient, être utilisée brute pour la préparation et la chlorocétone (72) suivante.

3-4-2-6 Préparation de la méthoxy-6 chloracétyl-4' flavone (72) (Figure 18)

0,64 g (0,002 mole) de méthoxy-6 diazoacétyl-4' flavone (71) est dissous dans 60 cm³ de tétrahydrofurane anhydre et la solution refroidie à 0°, est saturée pendant 10 minutes, par un courant d'acide chlorhydrique gazeux. Un dégagement d'azote est observé.

Après évaporation du tétrahydrofurane, le résidu cristallin de chloracétone est lavé plusieurs fois avec une solution aqueuse de bicarbonate de sodium à 5 %, puis abondamment à l'eau, jusqu'à ce que l'eau de lavage ait un pH neutre.

0,55 g de chloracétone est ainsi obtenu et recristallisé plusieurs fois dans l'alcool absolu jusqu'à point de Fusion constant : F = 180°.

Dosage du chlore *	Cl % calculé : 10,80
	Cl % trouvé : 10,91

* Le dosage du chlore a été effectué par le laboratoire de Micro-analyses de la Faculté des Sciences de Lyon.

Il est à noter que le rendement global en chloracétone (72) recristallisée calculé à partir de l'acide (69) de départ (3 étapes), est tout à fait satisfaisant 60 %.

3-4-2-7 Préparation de la méthoxy-6 acétoxyacétyl-4' flavone (73)
(Figure 18).

1,15 g (0,0035 mole) de la chloracétone (72) précédente et 2 g (0,024 mole) d'acétate de sodium, préalablement fondu, sont chauffés à reflux, pendant 12 heures, au bain d'huile à 130°, dans 20 cm³ d'anhydride acétique.

L'anhydride acétique en excès est ensuite évaporé et le résidu pâteux est repris par de l'eau. Peu à peu, l'acétoxy-méthyl cétone (73) devient cristalline. Le solide orangé est essoré, séché au dessiccateur puis recristallisé dans environ 150 cm³ d'alcool absolu bouillant.

Après trois recristallisations, le dérivé (73) ne donne plus qu'un seul spot en chromatographie sur Silicagel G, dans acétone-benzène (1-2) : Rf = 0,57 et son analyse élémentaire est satisfaisante.

3-4-3- Préparation de l'hydroxy-6 (buténolide $\beta, \Delta \alpha-\beta$)-4' flavone (75)
(Figure 18)

La formation du cycle buténolide en 4' de la méthoxy-6 flavone se décompose en deux étapes :

- la réaction de REFORMATSKY, réalisée sur la méthoxy-6 flavone acétoacétylée en 4', conduit dans un premier temps à un mélange du dérivé comportant en 4' le cycle buténolide $\alpha \beta$ insaturé, déjà formé, du dérivé comportant en 4' la lactone cyclisée mais saturée et hydroxylée en β de la fonction carbonyle et du dérivé à lactone non cyclodéshydratée.

- le chauffage à température élevée (130 - 140°) du mélange, dans l'acide chlorhydrique concentré, produit une déshydratation et une cyclodéshydratation des composés intermédiaires et conduit au buténolide $\alpha \beta$ insaturé cherché.

3-4-3-1 Préparation de la méthoxy-6 (buténolide $\beta, \Delta \alpha-\beta$)-4' flavone (74)
(Figure 18)

Réaction de REFORMATSKY :

0,3 g (0,00084 mole) de méthoxy-6 acétoxyacétyl-4' flavone (73) est dissous dans le minimum de benzène anhydre à chaud (soit environ 7 5 cm³) en présence de quelques cm³ de chloroforme pour améliorer la dissolution.

A cette solution sont ajoutés 3 cm³ de bromacétate d'éthyle.

Le mélange des réactifs est alors ajouté goutte à goutte à 2 g de poudre de zinc activée, c'est à dire, lavée avec de la soude diluée, puis à l'eau, avec de l'acide acétique dilué, puis à l'eau, à l'acétone, à l'éthanol, à l'éther et séchée pendant 48 heures à l'étuve à 100°.

La réaction est amorcée par chauffage local, puis l'addition des réactifs est réglée de façon à ce que le reflux du benzène soit auto entretenu. Lorsque l'addition des réactifs est terminée, le mélange est porté à reflux, au bain d'huile à 130°, pendant 1 h 30.

0,5 g de poudre de zinc activée est ajouté au milieu réactionnel, puis une deuxième fraction de 0,5 g est ajoutée à 5 minutes d'intervalle. Le reflux est encore maintenu pendant 30 minutes, puis après refroidissement, de l'acide sulfurique à 50 % est ajouté lentement sous agitation.

La phase organique est extraite au benzène, lavée à l'eau, séchée sur sulfate de magnésium, puis évaporée. Une huile brune visqueuse est obtenue.

Cyclodéshydratation en milieu chlorhydrique :

L'huile précédemment obtenue est dissoute dans 10 cm³ d'acide acétique, chauffée à reflux, au bain d'huile à 130°, pendant 1 heure avec 5 cm³ d'acide chlorhydrique concentré. Le mélange acide est versé dans 20 cm³ d'eau glacée : peu à peu, la méthoxy-6 (buténolide $\beta, \Delta \alpha-\beta$)-4' flavone (74) précipite.

Après 24 à 48 heures à + 4°, le précipité brun est essoré, lavé à l'éther, séché au dessiccateur et recristallisé dans l'alcool absolu.

Le rendement en produit brut est de 80 %, mais n'est plus que de 40 % en produit recristallisé : en effet, le dérivé (74) est très hygroscopique et sa recristallisation est délicate.

La méthoxy-6 (buténolide $\beta, \Delta \alpha-\beta$)-4' flavone (74) brute et recristallisée donne une réaction fortement positive (pourpre) avec le réactif de KEDDE (114) spécifique des lactones pentacycliques $\alpha \beta$ insaturées.

3-4-3-2 Préparation de l'hydroxy-6 (buténolide $\beta, \Delta \alpha-\beta$)-4' flavone (75) (Figure 18)

La déméthylation de la méthoxy-6 (buténolide $\beta, \Delta \alpha-\beta$)-4' flavone (74) est réalisée selon la technique décrite dans le chapitre 2 § 2-4-3. Le produit brut obtenu est recristallisé dans le mélange alcool-eau (3-2)

L'hydroxy-6 (buténolide $\beta, \Delta \alpha-\beta$)-4' flavone (75) brute et recristallisée donne de même, la réaction pourpre caractéristique avec le réactif de KEDDE. Par conséquent, les dérivés (74) et (75) comportent bien en 4' le cycle β buténolide $\alpha \beta$ insaturé intact.

3-4-4 Préparation de la glucosyloxy-6 (buténolide $\beta, \Delta \alpha-\beta$)-4' flavone (77) (Figure 18)

3-4-4-1 Préparation de la tétraacétyl glucosyloxy-6 (buténolide $\beta, \Delta \alpha-\beta$)-4' flavone (76).

La glucosylation du dérivé (75) est réalisée selon la méthode de KOENIGS KNORR (108). Le mode opératoire suivi est le même que celui utilisé pour la préparation des glucosides (31), (33), (42) et (58) acétylés.

3-4-4-2 Préparation de la glucosyloxy-6 (buténolide $\beta, \Delta \alpha-\beta$)-4' flavone (77)

La désacétylation du monoglucoside tétraacétylé (76) précédemment obtenu est réalisée selon la méthode de FUJISE et MITUI (109). Le mode opératoire suivi est le même que celui utilisé pour la préparation des glucosides (32), (34), (43) et (59).

Remarque : Nous n'avons pas pu mesurer les pouvoirs rotatoires du monoglucoside tétraacétylé (76) et du monoglucoside désacétylé (77), car leurs solutions même très diluées sont trop colorées.

Tableau XI

N°	Formules brutes	M	Solvants de recrist.	F°	Rdt%	Analyses						
						Calc. %			Tr. %			N
						C	H	N	C	H	N	
<u>63</u>	$C_{22}H_{14}N_2O_9$	450	Benzène	203	66	58,66	3,11	6,22	58,78	3,24	6,36	CN
<u>64</u>	$C_{22}H_{14}N_2O_9$	450	Acétone-dioxane 1-1	266	77	58,66	3,11	6,22	58,89	3,23	6,40	CN
<u>65</u>	$C_{15}H_9NO_5$ 1/2H ₂ O	283	EtOH abs.		85	61,85	3,43	4,81	62,01	3,33		CN
<u>66</u>	$C_{16}H_{11}NO_5 \cdot H_2O$	315	EtOH 95°	210	75	60,95	4,12	4,44	60,98	4,07	4,50	125
<u>67</u>	$C_{16}H_{13}NO_3$	267	EtOH 95°-eau 1-1	208	83	71,91	4,87	5,24	71,72	5,07	5,19	CN
<u>68</u>	$C_{17}H_{11}NO_3$	277	Benzène		80	73,64	3,97	5,05	73,12	4,13	5,03	CN
<u>69</u>	$C_{17}H_{12}O_5$	296	EtOH abs.		91	68,92	4,05		68,78	4,16		CN
<u>71</u>	$C_{18}H_{12}N_2O_4$	320	Benzène hexane 1-3	166- 170		67,50	3,89	8,75	67,49	3,89	8,56	CN
<u>72</u>	$C_{18}H_{13}ClO_4$	328,5	EtOH abs	180	60 /69	65,75	3,96		65,77		4,92	CN
<u>73</u>	$C_{20}H_{16}O_6$	352	EtOH abs.	188	60	68,18	4,54		67,95		4,71	CN

Tableau XII

N°	Formules brutes	M	Solvants de reconst.	F°	Rdt%	Analyses									Biblio.
						Calc. %			Tr. %						
						C	H	N	C	H	N				
<u>74</u>	$C_{20}H_{14}O_5$, 2H ₂ O	370	EtOH abs.	210 220	40	64,86	4,86		64,74	5,02			CN		
<u>75</u>	$C_{19}H_{12}O_5$, 2H ₂ O	356	EtOH 95°-eau	300 310	70	64,04	4,49		63,56	4,67			CN		
<u>76</u>	$C_{33}H_{30}O_{14}$	650	Alcool abs.	155	39	60,92	4,62		60,79	4,68			CN		
<u>77</u>	$C_{25}H_{22}O_{10}$, 2H ₂ O	500	EtOH 95°	238 240	53	57,91	5,02		58,20	4,92			CN		

4. ETUDE BIOCHIMIQUE ET PHARMACOLOGIQUE
DES GLUCOSIDES SYNTHETISES.

PLAN

=====

4-1 Introduction

4-2 Etude pharmacologique

4-3 Principe de l'expérimentation

4-4 Partie expérimentale

4-5 Résultats de l'expérimentation

4-6 Discussion des résultats. Conclusions.

4-1 INTRODUCTION

Depuis fort longtemps, les nombreux auteurs qui se sont penchés sur le mécanisme d'action des cardénolides, ont cherché à expliquer les effets observés sur le coeur, c'est à dire action chronotrope négative et action inotrope positive essentiellement, par un mécanisme unique, rendant compte à lui tout seul de tous les phénomènes observés.

Dès 1935, SCHATZMANN a montré que les glucosides cardiotoniques inhibent le mouvement actif du sodium et du potassium dans les globules rouges.

En 1965, REPKE observe que les Adénosines Triphosphatases ou ATPases de transport, activées par le sodium et le potassium sont inhibées par des concentrations en glucosides cardiotoniques de l'ordre de 10^{-8} M.

Depuis cette époque, de nombreux auteurs ont observé et étudié l'inhibition par les glucosides cardiotoniques, des ATPases activées par le sodium et le potassium. Cette inhibition a été étudiée sur des ATPases dépendant de Na^+ et K^+ , isolées le plus souvent des muscles cardiaques (132) ou des globules rouges de différentes espèces animales (133).

Lorsque les ATPases dépendant du sodium et du potassium sont inhibées par les glucosides cardiotoniques, une certaine quantité d'ATP n'est plus utilisée pour le transport actif du sodium et du potassium mais n'est pas pour autant accumulée dans le muscle cardiaque. Cet ATP devient disponible pour les autres systèmes enzymatiques qui règlent le travail cardiaque, et notamment pour les ATPases dépendant du magnésium et celles activées par le calcium qui ne sont pas inhibées par les cardénolides.

A l'heure actuelle, l'hypothèse retenue pour expliquer le mécanisme d'action des cardiotoniques est schématiquement la suivante :

En inhibant les ATPases dépendant du sodium et du potassium (fait réel, constaté avec tous les cardiotoniques testés), les glucosides cardiotoniques stimuleraient un certain nombre d'autres systèmes enzymatiques par l'apport supplémentaire d'ATP, entraînant ainsi une augmentation de la force contractile du coeur et un ralentissement du rythme cardiaque.

Les glucosides que nous avons synthétisés, principalement le monoglucoside (32) et le diglucoside (59), sont doués d'une activité cardiotonique non négligeable sur les cœurs isolés de cobaye et de rat *

C'est pourquoi, il nous a semblé intéressant d'étudier le comportement biochimique de ces glucosides vis à vis des ATPases dépendant du sodium et du potassium, en même temps qu'un échantillon témoin de ouabaïne, glucoside cardiotonique type, le plus souvent utilisé comme référence dans l'expérimentation pharmacologique et biochimique.

* L'étude pharmacologique de nos glucosides a été réalisée par Monsieur le Professeur A. CIER et ses collaborateurs dans les laboratoires de Pharmacologie de la Faculté de Médecine et de Pharmacie de LYON;

4-2 ETUDE PHARMACOLOGIQUE

L'étude pharmacologique de nos glucosides a été réalisée par Monsieur le Professeur A. CIER et ses collaborateurs dans les laboratoires de la Faculté de Médecine et de Pharmacie de LYON.

4-2-1 Technique de l'expérimentation.

L'expérimentation a eu pour objet de rechercher l'activité cardiotonique des trois glucosides 32, 34 et 59 de désoxybenzoïnes et du monoglucoside de flavone 77.

Les essais ont été effectués sur le coeur isolé de cobaye et de rat : technique de LANGENDORFF modifiée.

Le mode opératoire est le suivant :

Préalablement hépariné (5 000 U.I./kg, voie intrapéritonéale), l'animal (cobaye mâle de 650 g $\pm$ 30 et rat mâle 280 g $\pm$ 20) est anesthésié à l'éther et sacrifié par décapitation.

Immédiatement prélevé, le coeur est placé dans une cupule contenant du liquide de perfusion (*), refroidi à 5° C et additionné d'héparine (5 U.I./cm³).

L'aorte est canulée et la sonde manométrique est introduite dans le ventricule ; l'ensemble est monté sur l'appareil relié à un enregistreur

(*) Le liquide de perfusion utilisé présente la composition suivante :

NaCl 7,6g KCl 0,42 g CaCl₂ 0,24 g PO₄H₂O 0,15 g

MgCl₂ (6 H₂O) 0,05 g CO₃HNa 1,0 g Glucose 1,0 g par litre.

Il est oxygéné par barbotage d'un mélange d'O₂ (95 %) et de CO₂ (5 %) et perfusé à une température de 37° C ($\pm$ 1).

qui permet de suivre la fréquence et l'amplitude des contractions cardiaques dès le début de la perfusion.

En solution dans le Tyrode, les produits expérimentés ont été introduits dans le liquide de perfusion à l'aide d'une seringue de précision surmontée d'une aiguille fine piquée dans le tube en caoutchouc du perfuseur.

Pour chaque essai, l'ouabaïne a été utilisée pour déterminer la réactivité de la préparation et comparer les effets du produit expérimenté à ceux d'un cardénolide témoin.

4-2-2 Résultats des essais pharmacologiques

Les résultats obtenus sur le coeur de rat sont réunis dans le tableau XIII.

Les essais effectués sur le coeur isolé de cobaye sont un peu moins reproductibles mais cependant comparables.

Le monoglucoside 32 et le diglucoside 59 se sont avérés plus actifs que le triglucoside 34 dans les conditions expérimentales adoptées. Objectivée par des effets inotropes positifs et chronotropes négatifs, leur action cardiotonique est le dixième environ de celle de l'ouabaïne. Aux doses équiefficaces les durées d'action sont identiques.

L'ouabaïne est par contre nettement plus toxique.

Alors que le cardénolide provoque la mort chez le cobaye, en perfusion lente continue par voie veineuse ($0,025 \text{ mg/cm}^3$) ($0,5 \text{ cm}^3/\text{mn}$) à des doses comprises entre 0,20 et 0,30 mg/kg, les deux glucosides de synthèse 32 et 59, injectés dans les mêmes conditions à une concentration 100 fois plus forte ($2,5 \text{ mg/cm}^3$, $0,5 \text{ cm}^3/\text{mn}$), n'induisent aucune intoxication létale jusqu'à des doses supérieures à 70 mg/kg.

On note simplement une diminution de la fréquence cardiaque (-30 à -40 p. 100) sans observer, jusqu'à la fin de la perfusion, les signes électrocardiographiques de souffrance du myocarde caractéristiques

de l'intoxication aigue par l'ouabaïne dès la sixième minute de perfusion (0,100mg/kg chez le cobaye), soit après l'injection veineuse d'environ la moitié de la dose létale du cardénolide.

L'activité cardiotonique marquée des deux glucosides 32 et 59 parait ainsi d'autant plus intéressante que ces deux composés ne présentent qu'une toxicité très faible chez le cobaye, en essai aigu.

Le monoglucoside de flavone 77 est sans effet.

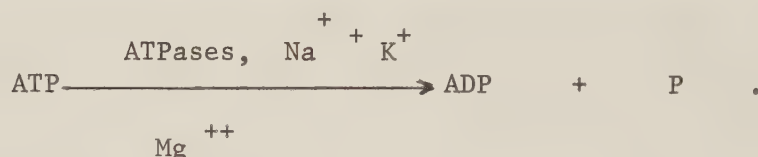
Tableau XIII

Composé	Concentration	Fréquence cardiaque (/ cm)		Amplitude cardiaque (mm)		Effets observés augmentation de l'amplitude	diminution de la fréquence
		avant	après	avant	après		
Ouabaïne	5×10^{-9}	12	6	5	17	240 %	50 %
	1×10^{-8}	11	6	5	18	260	46
<u>32</u>	5×10^{-8}	12	8	5	13	160	33
	5×10^{-8}	11	7	6	16	166	37
	5×10^{-7}	10	4	5	16	220	60
Ouabaïne	5×10^{-9}	20	18	8	18	125	10
	5×10^{-9}	20	17	9	22	144	15
<u>34</u>	5×10^{-8}	17	16	9	11	22	6
	5×10^{-7}	20	18	8	13	22	10
	2×10^{-6}	18	16	9	17	90	11
Ouabaïne	5×10^{-9}	21	15	5	16	220	29
	5×10^{-9}	15	10	5	28	460	33
<u>59</u>	5×10^{-9}	21	18	5	14	180	15
	5×10^{-8}	14	10	3	19	530	29
	5×10^{-7}	13	7	5	40	700	47
<u>77</u>	5×10^{-9}	18	18	7	6	-	-
	5×10^{-8}	18	18	6	6	-	-
	5×10^{-6}	14	15	8	6	(*) -	-

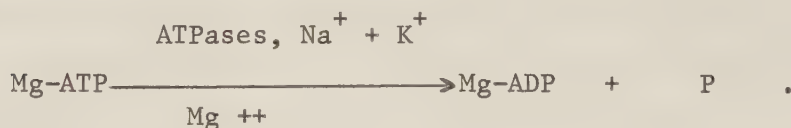
(*) Effet inotrope négatif (baisse de l'amplitude de 20 p 100)

4-3 PRINCIPE DE L'EXPERIMENTATION

Les ATPases dépendant du sodium et du potassium, présentes dans les extraits de muscle cardiaque et dans les érythrocytes, catalysent l'hydrolyse de l'ATP avec libération de phosphate minéral dans le milieu, selon le schéma :



En fait, il serait plus correct d'écrire :



car le complexe ATP-magnésium présente une constante d'association élevée (134) et, ce n'est pas l'ATP, mais le complexe Mg-ATP qui constitue le substrat des ATPases.

Le complexe Mg-ADP est à son tour hydrolysé, selon un processus beaucoup plus lent. La libération du phosphate minéral s'arrête à ce stade car le complexe Mg-AMP n'est pas hydrolysé par les ATPases.

Il apparaît donc relativement aisé de suivre et de mesurer l'activité ATPasique d'une préparation par dosage de la quantité de phosphate minéral libéré dans le milieu d'incubation.

En présence d'un inhibiteur des ATPases, par exemple l'ouabaïne, la quantité de phosphate minéral libéré dans le milieu d'incubation sera considérablement diminuée, voire même pratiquement nulle si la concentration en inhibiteur utilisée est suffisamment importante pour bloquer tout le système.

4-3-1 Choix de l'extrait enzymatique.

A première vue, il semblerait logique, pour tester l'activité cardiotonique de nos glucosides, d'utiliser une préparation enzymatique extraite du

muscle cardiaque de rat ou de cobaye. Et en effet, la plupart des études enzymologiques sur l'activité cardiotonique des cardénolides ont été réalisées avec de telles préparations. Cependant, il nous est apparu rapidement que l'isolement d'un extrait enzymatique des ATPases dépendant du sodium et du potassium, à partir du muscle cardiaque, présentait de sérieuses difficultés.

Outre le prélèvement de l'organe et sa dissection qui doivent être très rapides, la suite de la préparation de l'extrait enzymatique fait appel à des procédés plus ou moins traumatisants car les ATPases sont des enzymes de membrane très difficiles à décrocher. La technique de préparation fait appel à de nombreuses centrifugations à des vitesses de rotation élevées, et la meilleure solution pour obtenir une préparation enzymatique fine serait l'ultracentrifugation.

Depuis ces vingt dernières années, de nombreux auteurs ont étudié les systèmes enzymatiques présents dans les érythrocytes humains et particulièrement les ATPases dépendant du sodium et du potassium, responsables du transport actif de ces ions à travers la membrane cellulaire. Ces auteurs ont longtemps pensé que ces ATPases de membrane, présidant au transport actif du sodium et du potassium ne pouvaient fonctionner que dans des cellules intactes. Or, en 1960, R.L. POST (83) et ses collaborateurs ont montré que ces ATPases étaient toujours normalement actives, dans des extraits de membrane isolés des globules rouges.

Ces auteurs ont préparé et isolé un système enzymatique insoluble, à activité ATPase, à partir des membranes des érythrocytes humains, et l'ont purifié 31 fois par rapport aux cellules intactes.

Le système enzymatique ainsi préparé contient deux ATPases distinctes :

- une ATPase qui ne fonctionne qu'en présence de sodium et de potassium
- une ATPase qui fonctionne en l'absence de ces deux ions.

Les deux ATPases nécessitent la présence de magnésium en quantité équimoléculaire avec l'ATP dans le milieu d'incubation.

Ainsi, en présence de magnésium uniquement, seule l'ATPase dite "ATPase dépendant du magnésium" est active. En présence de magnésium, de sodium

et de potassium, l'ATPase dite "ATPase dépendant du sodium et du potassium", entre à son tour en action et les deux ATPases agissent conjointement.

Ces travaux ont tout de suite retenu notre attention pour deux raisons essentielles :

- Tout d'abord, les extraits enzymatiques préparés selon cette méthode répondent tout à fait normalement à l'action des glucosides cardiotoniques. Avec l'ouabaïne, les auteurs ont observé le même type d'inhibition que celui couramment constaté avec les préparations de muscle cardiaque. L'ouabaïne et les cardiotoniques en général inhibent uniquement l'ATPase dépendant du sodium et du potassium.

Par conséquent, il était donc possible et tout à fait valable de tester le comportement biochimique de nos glucosides, sur un tel système.

- Et surtout, la préparation de l'extrait enzymatique à partir du sang est très simple, rapide, fait appel uniquement à des lavages suivis de centrifugations.

Par conséquent, pour l'étude biochimique de nos glucosides, nous avons choisi comme extrait enzymatique, le système ATPase isolé des érythrocytes selon la méthode de POST (83), en raison principalement de la simplicité et de la rapidité de la technique de préparation.

Pour des raisons pratiques, nous avons choisi non pas des érythrocytes humains mais des érythrocytes de lapin. Le sang de lapin est évidemment beaucoup plus accessible dans un laboratoire et peut parfaitement remplacer le sang humain pour l'expérimentation.

Le seul inconvénient à noter est que le lapin est beaucoup moins sensible aux glucosides cardiotoniques que l'homme.

4-3-2 Principe des mesures d'inhibition de l'activité ATPase de la préparation enzymatique par les glucosides synthétisés.

En présence d'une certaine quantité de substrat, le complexe ATP-Mg, que nous avons choisie et gardée constante tout au long de l'expérimentation, et de sodium et de potassium, lors de l'incubation à 37°, le système enzymatique que nous avons préparé, va libérer une certaine quantité de phosphate

minéral dans le milieu d'incubation. La quantité de phosphate minéral apparue dans le milieu sera dosée par photolorimétrie, selon la méthode modifiée de FISKE et SUBBA ROW (135).

En présence de concentrations variables d'un inhibiteur témoin, l'ouabaïne la quantité de phosphate minéral libérée dans le milieu d'incubation sera plus ou moins diminuée, en fonction de la concentration en inhibiteur utilisée.

La densité optique mesurée au photolorimètre est proportionnelle à la quantité de phosphate minéral apparue dans le milieu et, par conséquent, à l'activité ATPase de la préparation enzymatique.

Nous tracerons les courbes $D_o = f(I)$, c'est à dire, la densité optique lue au photolorimètre, en fonction de la concentration en inhibiteur, pour une concentration donnée et constante de substrat. De telles courbes, traduisant l'activité ATPase du système en fonction de la concentration en inhibiteur, nous permettront de calculer l'indice d'inhibition 50 : I_{50} , caractéristique d'un inhibiteur, dans des conditions expérimentales données.

De la même façon, nous regarderons comment varie l'activité ATPase de la préparation enzymatique, en présence de concentrations variables des glucosides à tester. Dans un premier temps, nous verrons s'ils sont actifs, c'est à dire, s'ils modifient l'activité ATPase initiale de la préparation. Puis, dans un deuxième temps, s'ils sont actifs et inhibiteurs, nous déterminerons graphiquement, dans la mesure du possible, les indices d'inhibition 50 caractéristiques de chacun des glucosides testés.

L'indice d'inhibition 50 : I_{50} est défini comme la concentration en inhibiteur provoquant une réduction de 50 % de la vitesse initiale.

Dans notre cas particulier, nos glucosides testés ont une limite de solubilité de l'ordre de 10^{-4} M. Par conséquent, à cette concentration, nous aurons l'inhibition maximale qu'il soit possible d'obtenir dans le cadre de notre expérimentation tout au moins. Pour calculer les indices d'inhibition 50 approchés, qui nous permettront de comparer le pouvoir

inhibiteur des différents produits testés, nous désignerons arbitrairement l'inhibition maximale observée par inhibition 100 %, et par I'_{50} l'indice approché ainsi calculé.

4-4 PARTIE EXPERIMENTALE

4-4-1 Préparation de l'extrait enzymatique.

Pour cette préparation, nous avons suivi assez fidèlement celle décrite par POST (83) pour du sang humain, mais nous l'avons réalisée sur du sang de lapin.

Un lapin est sacrifié et son sang est recueilli sur héparine. Pour un lapin de taille moyenne, 20 cm³ environ de sang sont récupérés.

Le sang est tout d'abord lavé trois fois avec 120 cm³ de solution de chlorure de sodium à 9 pour 1000, à température ambiante. A l'issu du dernier lavage par centrifugation, la solution saline surnageante doit être incolore.

Au cours de ces premiers lavages avec la solution saline à 9 pour 1000, les centrifugations sont réalisées sur une centrifugeuse Couprie, réfrigérée entre 10 et 15°.

Le culot de centrifugation, constitué par les globules rouges est alors remis en suspension dans 100 cm³ environ d'eau distillée, puis, les globules rouges sont hémolysés rapidement au Potter. L'hémolysat est centrifugé pendant 20 minutes à 20 000 g, sur centrifugeuse MSE, réfrigérée au voisinage de 0°.

Après cette première centrifugation à vitesse élevée, l'hémolysat a sédimenté en trois couches superposées :

- le surnageant limpide coloré en rose clair par l'hémoglobine,
- une zone floconneuse, blanchâtre, assez mal délimitée, constituée par les membranes des hématies,
- un culot de centrifugation, constitué par les globules rouges non hémolysés.

Seule la zone intermédiaire, constituée par les membranes des globules rouges est recueillie, après élimination du surnageant et du culot de centrifugation.

Le volume de la fraction floconneuse recueillie est complété à 140 cm^3 environ avec du tampon histidine-imidazole $5 \times 10^{-4} \text{ M}$, ajusté à pH 7,1 avec de l'acide chlorhydrique dilué, et la suspension est à nouveau centrifugée pendant 10 minutes à 10 000 g. La zone intermédiaire, constituée par les membranes des globules rouges est à nouveau remise en suspension dans du tampon histidine-imidazole $5 \times 10^{-4} \text{ M}$, ajusté à pH 7,1. Ces lavages par centrifugations suivis d'une remise en suspension dans le tampon à pH 7,1 sont poursuivis jusqu'à ce que le surnageant ne contienne plus de trace d'hémoglobine et soit donc parfaitement incolore. Le précipité blanchâtre que les Anglo-Saxons désignent sous le terme de "ghosts", est soigneusement recueilli après décantation du surnageant et élimination du culot de centrifugation.

12 cm^3 environ de tampon Tris-glycylglycine 0,1 M, ajusté à pH 8,1, sont ajoutés au précipité et le volume de la suspension est complété à 140 cm^3 avec de l'eau distillée.

La suspension est centrifugée pendant 20 minutes à 16 000 g.

Ce traitement a pour but de disloquer les membranes, ce qui libère à nouveau une certaine quantité d'hémoglobine. Cette hémoglobine est peu à peu éliminée par lavages avec du tampon Tris-glycylglycine $5 \times 10^{-4} \text{ M}$, à pH 8,1, suivis de centrifugations à 16 000 g. Les lavages sont poursuivis jusqu'à ce que le surnageant soit parfaitement incolore. La préparation est alors terminée.

Le précipité blanchâtre, floconneux, est recueilli; le volume de la suspension est amené à 50 cm^3 environ avec du tampon histidine-imidazole $5 \times 10^{-4} \text{ M}$, à pH 7,1. La préparation enzymatique ainsi obtenue est conservée à -17° , et, ce qui est appréciable, elle peut aisément être conservée deux à trois semaines à cette température, avec seulement une légère perte d'activité.

4-4-2 Protocole expérimental.

Dans un premier temps, il est nécessaire de tester l'activité enzymatique de la préparation afin de déterminer les conditions expérimentales

dans lesquelles nous serons amené à réaliser l'étude du comportement de nos glucosides vis à vis des ATPases ainsi isolées.

Il s'agit de déterminer quel volume d'extrait enzymatique nous devons utiliser pour avoir une activité ATPase suffisante pour être observable, mais pas trop importante. Cette activité ATPase se traduit directement par le pourcentage d'hydrolyse de l'ATP (substrat de l'enzyme) en phosphate minéral.

Or, pour que l'expérimentation soit valable, nous devons nous placer au stade dit de "vitesse initiale de la réaction", période pendant laquelle l'activité enzymatique croît de façon linéaire en fonction du temps.

Pour que cette condition soit réalisée, il ne faut pas que le pourcentage d'hydrolyse de l'ATP observé, dépasse 12 %.

4-4-2-1 Mesure de l'activité ATPase de l'extrait enzymatique.

- Préparation du substrat de l'enzyme

- 500 μ Moles d'ATP disodique sont dissoutes dans le minimum d'eau distillée : 2 à 3 cm³, et cette solution est passée par une colonne de résine Dowex x 50, échangeuse de cations, afin d'éliminer le sodium et éventuellement le potassium dans la solution d'ATP.

- A l'éluat, débarassé des cations, sont ajoutées 500 μ Moles de chlorure de magnésium : Mg Cl₂, 10 millimoles d'histidine et 10 millimoles d'imidazole. La solution est ajustée à pH 7,1 avec du tampon Tris et son volume est complété à 50 cm³ avec de l'eau distillée.

Chaque prise d'essai de 0,5 cm³ contient donc, 5 μ moles d'ATP et 5 moles de Mg Cl₂.

- Solution aqueuse de sodium et de potassium.

Les concentrations en sodium et potassium utilisées sont celles décrites par POST dans son protocole expérimental. De façon à obtenir une concentration finale de 0,080 M en sodium et de 0,033 M en potassium dans les 2,5 cm³ du milieu d'incubation, nous avons préparé une solution mère 0,4 M en sodium et 0,165 M en potassium.

Notons que ces concentrations en sodium et potassium décrites par POST sont prévues pour une activité optimale des ATPases extraites des érythrocytes humains. Après quelques expériences préliminaires, nous avons vu qu'elles convenaient très bien également pour les ATPases extraites des érythrocytes de lapin.

- Technique de l'expérimentation.

Chaque essai est préparé de la façon suivante :

- 0,5 cm³ de substrat : ATP + Mg Cl₂
- 0,5 cm³ de solution mère de Na Cl et K Cl ou
0,5 cm³ d'eau distillée
- 0,1 à 0,5 cm³ d'extrait enzymatique.

et complété à un volume final de 2,5 cm³ avec de l'eau distillée.

Les essais sont incubés pendant une heure, au bain marie à 37°, puis la réaction enzymatique est bloquée par addition de 0,5 cm³ d'acide trichloracétique (TCA) à 50 %. La fraction protéique floccule immédiatement.

Chaque essai est centrifugé pendant 10 minutes, puis 2 cm³ de surnageant limpide sont prélevés pour le dosage du phosphate minéral.

- Dosage du phosphate minéral selon la méthode modifiée de FISKE et SUBBA ROW (136).

Aux 2 cm³ de surnageant sont ajoutés :

- 0,8 cm³ de solution de molybdate d'ammonium MoO₄NH₄ à 2,5 %
- 0,4 cm³ d'acide sulfurique 10 N

Ces deux réactifs peuvent être mélangés extemporanément suivant les proportions indiquées et l'on ajoute alors 1,2 cm³ du mélange acide.

Puis à quelques minutes d'intervalle :

- 0,4 cm³ de réactif bisulfite de FISKE et SUBBA ROW (136)
- 4,6 cm³ d'eau distillée.

Ces deux réactifs peuvent être, de même, mélangés extemporanément suivant les proportions indiquées et l'on ajoute alors 5 cm³ du mélange.

Après agitation vigoureuse, on laisse la coloration bleue se développer et se stabiliser pendant 15 minutes, puis les densités optiques sont mesurées au photolorimètre Meunier (filtre 720 nm).

Le zéro du photocalorimètre (blanc) est réalisé sur une solution contenant tous les réactifs du dosage ajoutés, dans les mêmes proportions, à 2 cm³ d'eau distillée.

Pour connaître la quantité réelle de phosphate minéral libéré au cours de la réaction, il est nécessaire de réaliser au préalable une courbe étalon donnant la densité optique en fonction de la concentration en phosphate minéral : cette courbe est une droite.

Pour chaque expérimentation, il faut de plus vérifier que la préparation enzymatique ne contient pas au départ de phosphate minéral, donc prévoir un témoin contenant uniquement de l'enzyme sans substrat.

Il faut également réaliser un témoin sans enzyme, toutes les autres quantités étant maintenues par ailleurs, car l'ATP peut subir une hydrolyse chimique, ce qui se produit généralement lors de la préparation du dosage, au contact de la solution acide de molybdate d'ammonium.

Enfin, pour réduire au maximum la dispersion des résultats due aux erreurs fortuites de manipulation, il est nécessaire de préparer chaque essai en double.

4-4-2-2 Mesure de l'inhibition de l'activité ATPase

Avant de tester les glucosides que nous avons synthétisés, nous avons tout d'abord étudié le comportement de l'ouabaïne, glucoside cardiotonique type, afin d'avoir une base de référence.

Le protocole expérimental est le même que celui utilisé pour les mesures préliminaires de l'activité de l'extrait enzymatique préparé :

Pour chaque essai, nous avons remplacé l'eau distillé par 1 cm³ de solution de la drogue à tester, à des concentrations variables, toutes les autres quantités étant maintenues par ailleurs,

Pour chaque concentration en oubaïne ou en glucosides utilisée, nous avons réalisé quatre essais :

- deux essais identiques, avec Na^+ et K^+ , pour mettre en évidence l'ATPase dépendant du sodium et du potassium

- deux essais identiques, sans sodium ni potassium, pour mettre en évidence l'ATPase dépendant du magnésium.

En présence de sodium et de potassium, les deux ATPases agissent conjointement ; en l'absence de ces deux ions, l'ATPase dépendant du sodium et du potassium est inactive, et seule, l'ATPase dépendant du magnésium fonctionne.

4-5 RESULTATS DE L'EXPERIMENTATION

4-5-1 Etude de l'inhibition des ATPases par l'ouabaïne (Figure 19)

Les courbes : $Do = f(I)$ que nous obtenons, en présence de sodium et de potassium et en l'absence de sodium et de potassium, pour l'ouabaïne, ont sensiblement la même allure générale que celles obtenues par POST (83), avec une préparation enzymatique extraite des érythrocytes humains.

Comme l'ont observé POST et ses collaborateurs, l'ouabaïne inhibe uniquement l'ATPase dépendant du sodium et du potassium. En l'absence de ces deux ions, l'ouabaïne ne modifie pratiquement pas l'activité de base de l'ATPase dépendant du magnésium.

Par rapport aux expériences de POST, réalisées avec une préparation obtenue à partir du sang humain, nous observons chez le lapin une très nette différence de sensibilité à l'ouabaïne.

Alors que l'ouabaïne est encore active à une concentration de l'ordre de 10^{-8} M, chez l'homme, et que son indice d'inhibition 50: I_{50} est de 10^{-7} M, chez le lapin, son activité inhibitrice ne se manifeste pratiquement plus pour une concentration de l'ordre de 10^{-6} M et son indice d'inhibition 50 : I_{50} n'est plus que de 3×10^{-5} M.

Nous pouvons très schématiquement dire que le lapin est environ 100 fois moins sensible aux cardiotoniques que l'homme.

4-5-2 Etude de l'inhibition des ATPases par le monoglucoside (32) (Figure 20)

En observant les courbes $Do = f(I)$ obtenues, en présence de sodium et de potassium et en leur absence, pour le monoglucoside (32), nous notons tout de suite une différence fondamentale avec celles obtenues pour l'ouabaïne.

Figure 19 - Inhibition des ATPases par l'ouabaine

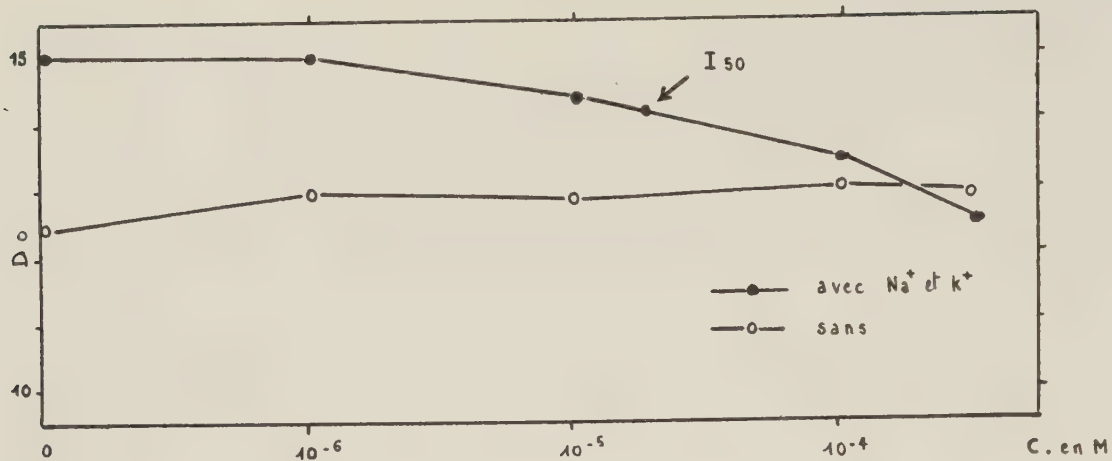


Figure 20 - Inhibition des ATPases par le monoglucoside (32)

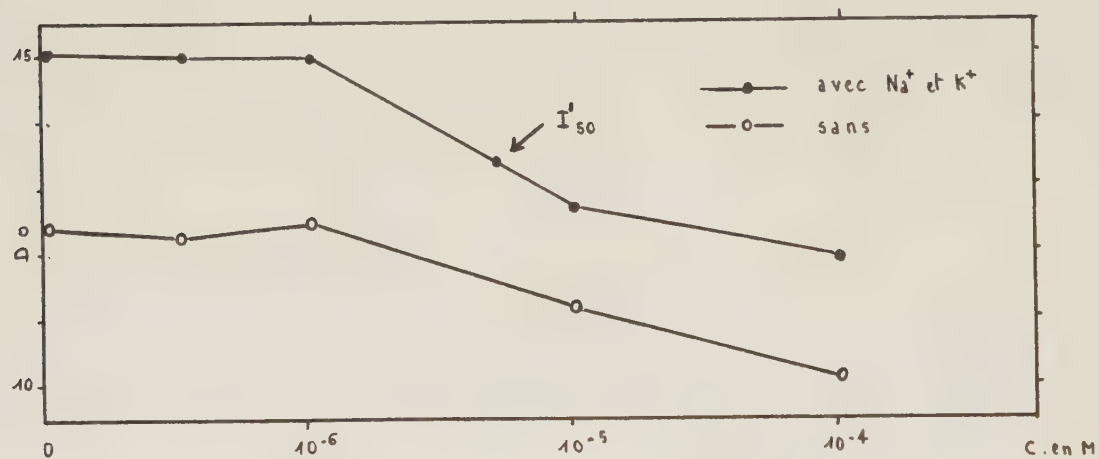
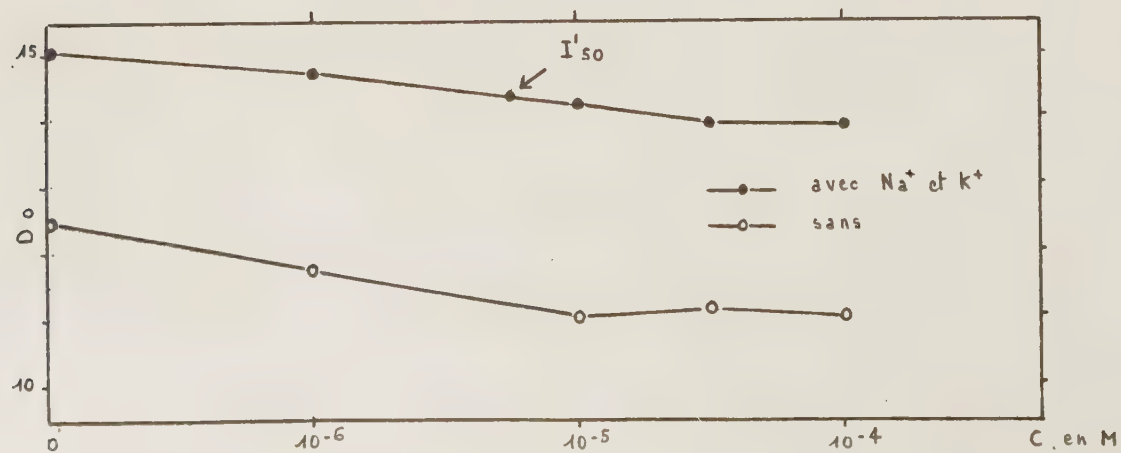


Figure 21 - Inhibition des ATPases par le diglucoside (59)



Comme l'ouabaine, le monoglucoside (32) exerce une action inhibitrice mais il inhibe les deux ATPases, celle qui dépend du sodium et du potassium et celle qui ne dépend que du magnésium.

En effet, en l'absence de Na^+ et K^+ , l'activité ATPase est encore fortement diminuée. C'est donc que le monoglucoside (32) inhibe l'ATPase dépendant du magnésium. En présence de Na^+ et K^+ , l'activité ATPase observée est une activité globale due aux deux ATPases. Puisque l'ATPase dépendant de Mg^{++} est inhibée par le monoglucoside (32), il est normal que l'activité globale soit diminuée.

Cependant, pour une concentration nulle en monoglucoside (32), la différence de densité optique est de 2,6. Elle n'est plus que de 1,8 pour une concentration de 10^{-5} M.

C'est donc que le monoglucoside (32) inhibe également l'ATPase dépendant de Na^+ et K^+ , cependant l'inhibition de l'ATPase dépendant de Mg^{++} est prépondérante.

En ce qui concerne le pouvoir inhibiteur global du monoglucoside (32), nous pouvons dire, dans le cadre de nos expériences, qu'il est sensiblement supérieur à celui de l'ouabaine. L'indice d'inhibition 50 approché, I'_{50} est même légèrement inférieur à celui de l'ouabaine : 7×10^{-6} M contre 3×10^{-5} M pour l'ouabaine.

L'indice d'inhibition 50 approché, I'_{50} du monoglucoside (32) vis à vis de l'ATPase dépendant de Mg^{++} est de 10^{-5} M.

4-4-3 Etude de l'inhibition des ATPases par le diglucoside (59) (Figure 21)

Pour le diglucoside (59), les courbes montrent que l'inhibition observée est uniquement celle de l'ATPase dépendant du magnésium, puisque la différence de densité optique observée, en présence de Na^+ et K^+ et en leur absence, est sensiblement constante pour une concentration nulle en diglucoside (59) et pour les fortes concentrations.

Figure 22 - Inhibition des ATPases par le triglucoside (34)

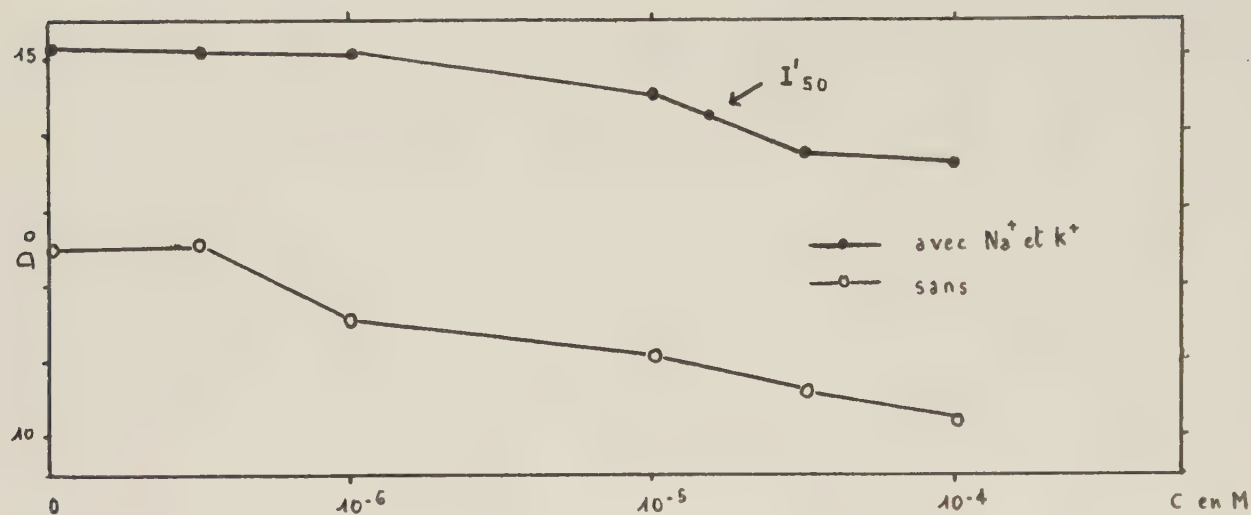
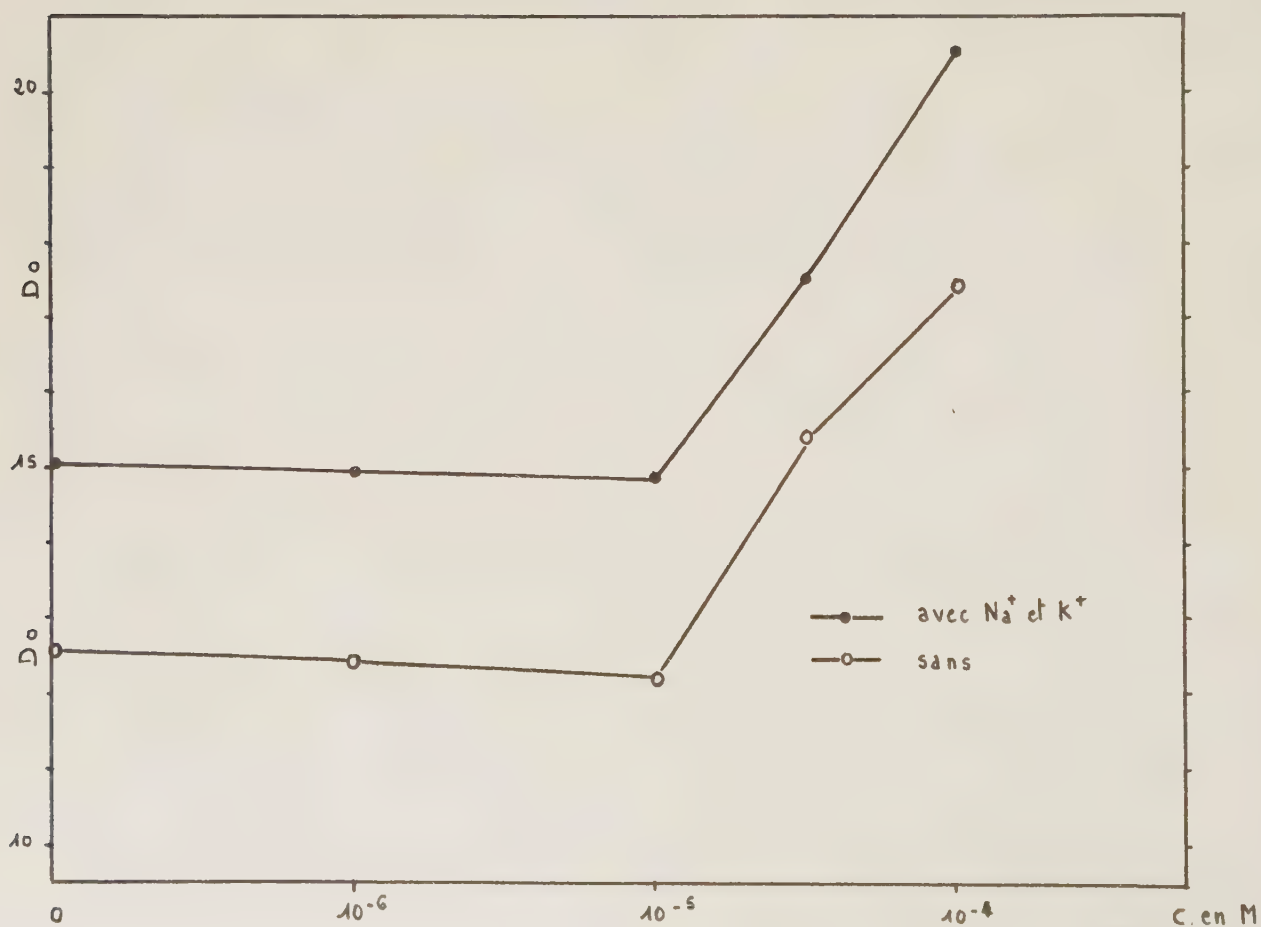


Figure 23 - activation des ATPases par le monoglucoside de flavone (77)



L'ATPase dépendant de Na^+ et K^+ n'est pratiquement pas touchée par le diglucoside (59).

Nous voyons d'autre part que l'inhibition globale est assez faible en valeur absolue bien que l'indice d'inhibition 50 approché soit du même ordre : 8×10^{-6} M que celui du monoglucoside (32).

Le diglucoside (59) est donc moins actif que le monoglucoside (32).

4-4-4 Etude de l'inhibition des ATPases par le triglucoside (34) (Figure 22)

Comme le diglucoside (59), le triglucoside (34) inhibe uniquement l'ATPase dépendant du magnésium. L'inhibition observée est encore plus faible puisque l'indice d'inhibition 50 approché, I'_{50} est de 3×10^{-5} M (équivalent à celui de l'ouabaïne).

Le triglucoside (34) est donc moins actif que le diglucoside (59), lui-même moins actif que le monoglucoside (32).

4-4-5 Etude de l'activation des ATPases par le monoglucoside de flavone (77) (Figure 23)

Les courbes $D_0 = f(I)$, montrent que pour des concentrations inférieures à 10^{-5} M, le monoglucoside de flavone (77) n'a aucune action sur les deux ATPases. Mais, pour des concentrations supérieures à 10^{-5} M, nous observons, fait inattendu et surprenant, une activation considérable de l'activité ATPase globale.

Les deux courbes avec Na^+ et K^+ et sans Na^+ et K^+ ont des tracés sensiblement parallèle. C'est donc que le monoglucoside de flavone (77) active préférentiellement l'ATPase dépendant du magnésium.

4-6 DISCUSSION DES RESULTATS . CONCLUSIONS.

L'étude du comportement biochimique de nos glucosides, réalisée "in vitro", vis à vis des ATPases isolées des érythrocytes de lapin, vient en complément de l'étude pharmacologique réalisée sur le coeur isolé de cobaye ou de rat.

Pour chaque glucoside, nous avons effectué en moyenne trois expériences, et pour chaque expérience, nous avons réalisé les mesures en double pour chaque concentration en inhibiteur essayée.

Cependant, nos mesures biochimiques auraient pu être plus approfondies : il aurait été nécessaire de vérifier de façon plus rigoureuse la reproductibilité des mesures et de multiplier encore les expériences pour limiter la dispersion statistique.

Les résultats que nous avons obtenus ne sont pas absolus mais nous ont permis néanmoins de réaliser une approche des phénomènes qui se passent non plus au niveau de l'organe isolé, mais à l'échelle microscopique, au niveau enzymatique.

Nos mesures biochimiques nous ont permis d'ébaucher un profil du comportement de chacun de nos glucosides vis à vis des ATPases dépendant du sodium et du potassium, et du magnésium.

Pour les trois glucosides de désoxybenzoïnes 32, 34 et 59, les résultats obtenus ne sont pas tout à fait ceux que nous attendions puisque ces produits inhibent bien l'activité ATPase de la préparation, mais inhibent préférentiellement l'ATPase dépendant du magnésium, alors que les cardénolides en général et plus particulièrement l'ouabaine que nous avons choisie comme référence, inhibent l'ATPase dépendant du sodium et du potassium.

Par conséquent, l'activité cardiotonique de nos produits, manifestée de façon certaine au cours de l'étude pharmacologique, sur le coeur isolé de cobaye et de rat, doit procéder, au niveau enzymatique, "in vitro", d'un mécanisme quelque peu différent de celui des cardénolides naturels.

En ce qui concerne la monoglucoside de flavone 77, les résultats obtenus ont été tout à fait surprenants puisque ce produit active, à des concentrations de l'ordre de 2×10^{-5} M l'activité ATPase globale de la préparation et plus particulièrement l'ATPase dépendant du magnésium. Pour des concentrations équivalentes, *in vivo*, le dérivé 77 manifeste une action inotrope négative.

Pour tenter de trouver une explication à ce phénomène, il faut remonter à la stéréochimie des cardénolides naturels et à celle de nos glucosides.

Dans l'introduction générale de ce travail, nous avons vu que la molécule des cardénolide, dans l'espace, ne s'inscrit pas dans un plan, mais que, au contraire, elle présente une bourbure assez marquée, la fonction lactone étant très nettement située au dessus du plan moyen de la molécule (Figure 3).

Pour nos glucosides de désoxybenzoïne, la structure n'est pas figée, bien au contraire. Il se produit une libre rotation importante au niveau du carbonyle de la désoxybenzoïne, ce qui imprime une grande souplesse à toute la molécule. Les modèles moléculaires nous ont permis de voir qu'une telle molécule peut se déformer considérablement dans toutes les positions de l'espace et en particulier, dans une position tout à fait analogue à celle des cardénolides naturels.

Dans le squelette flavonique, au contraire, aucune déformation n'est permise et la molécule s'inscrit dans un plan moyen tout à fait rigide.

Ainsi donc, les molécules des glucosides des désoxybenzoïnes peuvent, en se déformant, s'orienter dans l'espace de la même façon que les cardénolides naturels d'où leur activité voisine de celle des cardénolides à l'échelle enzymatique : ces produits sont inhibiteurs du système ATPase.

Le monoglucoside de flavone 77, au contraire, ne peut se déformer et, dans l'espace sa structure est assez éloignée de celle des cardénolides, ce qui pourrait expliquer, tout au moins en partie, les phénomènes observés "*in vitro*" ; pas d'activité jusqu'à des concentrations de l'ordre de 10^{-5} M, et importante activation des ATPases pour des concentrations supérieures à 2×10^{-5} M, et "*in vivo*" : effet inotrope négatif pour des concentrations supérieures à 5×10^{-6} M.

CONCLUSION

Dans la première partie de ce travail, nous avons synthétisé les glucosides (32), (34) et (59) de désoxybenzoïnes à fonction lactone. Le cycle β buténolide α β insaturé a été construit en début de synthèse sur le noyau phényle des acides phényl et phényl α éthyl acétiques, puis le reste de la molécule a été élaboré progressivement.

Dans la deuxième partie de ce travail, nous avons synthétisé un glucoside (77) de flavone à fonction lactone en 4'. Nous avons d'abord construit le squelette flavonique selon le procédé de BAKER-VENKATARAMAN, et le cycle β buténolide α β insaturé a été élaboré progressivement dans les dernières étapes de la synthèse.

Dans les deux cas, la glucosylation a été l'ultime étape de la synthèse.

Dans le domaine de la synthèse d'analogues des cardénolides, les travaux réalisés jusqu'à présent ont surtout porté sur des modifications et transformations de molécules à squelette de base stérolique. Si les analogues à squelette de base simplifié, non stérolique, synthétisés jusqu'à présent présentaient bien une fonction lactone, aucun ne comportait à la fois un cycle buténolide α β insaturé et un résidu sucre, dont nous avons vu, tout au long de ce travail, l'importance pour l'efficacité biologique.

Les glucosides de désoxybenzoïnes que nous avons synthétisés agissent in vivo de la même façon que l'ouabaïne. Ils sont cependant environ dix fois moins actifs que ce cardénolide témoin, mais beaucoup moins toxiques.

In vitro au contraire, ces trois glucosides de désoxybenzoïnes inhibent l'ATPase dépendant du magnésium alors que l'ouabaïne inhibe l'autre ATPase dépendant du sodium et du potassium.

Le glucoside de flavone se comporte de façon originale en activant l'ATPase dépendant du magnésium. Bien que ce composé présente une fonction lactone et un résidu sucre dans sa molécule, il n'est pas cardiotonique ; il a même, in vivo, un effet inotrope négatif, aux fortes concentrations. C'est donc que le squelette de base portant les

fonctions indispensables à l'activité cardiotonique joue également un rôle primordial. Le squelette flavonique étant rigide et figé, il est permis de supposer que la molécule de glucoside ne peut s'adapter parfaitement au récepteur enzymatique, alors que, le squelette des désoxybenzoïnes étant très souple et facilement déformable, les glucosides de désoxybenzoïnes pourraient épouser étroitement la forme du récepteur un peu de la même façon que les cardénolides naturels.

Vu.

Les membres du jury :

Chopin

Pacheco

A. Groviller

Nisley

Vu et approuvé.

Le Directeur de l'U.E.R.
de Chimie Biochimie

Daniel Audin

MM. CHOPIN

PACHECO

CIER

M^{te} GROVILLER

Vu et accordé le permis d'imprimer.

Lyon, le 11 juin 1971

Le Président de l'Université
Claude Bernard,

15

J. BOIDIN

BIBLIOGRAPHIE

- 1 K.K. CHEN, F.G. HENDERSON et R.C. ANDERSON, J. Pharmacol., 1950, 99, 395-400
- 2 L.F. FIESER et M. FIESER, Steroids, Reinhold Publishing Corporation, London, 1959 - p. 727 - 809
- 3 J. LA BARRE, Pharmacodynamie Biochimique, p. 663 - 665
- 4 T. REICHSTEIN et E. WEISS, Advan. Carbohydrate Chem., 1953, 8, 45
- 5 W. KLYNE, Biochem. J., 1950, 47, xli.
- 6 C.H. TAMM, Proc. Intern. Pharmacol. Meeting, 1st, Stockholm, 1961, 3, 47
- 7 CP. LICHTI et VON WARTBURG, Helv. chim. Acta, 1960, 43, 1667
- 8 H. BAUMANN et W. PIGMAN, The Carbohydrates, Academic Press, New York, 1957, p 562
- 9 E.K. WEISS et T. REICHSTEIN, Advan. Carbohydrate Chem., 1962, 17, 65
- 10 S. HANESSIAN, Advan. Carbohydrate Chem., 1966, 21, 143
- 11 BHAGIRATH SINGH et R.P. RASTOGI, Phytochemistry, 1970, 9, 315 - 331
- 12 W. W. ZORBACH et K. VENKATRAMANA BHAT, Advan. Carbohydrate Chem., 1966, 21, 273
- 13 K.K. CHEN, Proc. Intern. Pharmacol. Meeting, 1st, Stockholm, 1961, 3, 27
- 14 F.G. HENDERSON et K. K. CHEN, J. Med. Chem., 1965, 8, 577
- 15 E. STAHL, Thin Layer Chromatography, Academic Press, New York, 1965, 272
- 16 PL. A. PLATTNER, L. RUZICKA, H. HENSSER et E. AUGLIKER, Helv. Chim. Acta, 1947, 30, 1073
- 17 N. DANIELI, Y. MAZUR et F. SONDHEIMER, J. Am. Chem. Soc., 1962, 84, 875
- 18 J.M. FERLAND, Y. LEFEBVRE et K. WEISNER, Tetrahedron Letters, 1966, 30, 3617 - 3620
- 19 F. C. UHLE et R. C. ELDERFIELD, J. Org. Chem., 1943, 8, 162
- 20 K. REYLE, K. MEYER et T. REICHSTEIN, Helv. Chim. Acta, 1950, 33, 1541
- 21 W. W. ZORBACH et K. VENKATRAMANA BHAT, Advan. Carbohydrate Chem. 1966, 21, 273

- 22 A. GUBLER et C. H. TAMM, *Helv. Chim. Acta*, 1958, 41, 297
- 23 S. M. KUPCHAN, C.H. SIH, N. KATSUI et O. El. TAYEB, *J. Am. Chem. Soc.*, 1962, 84, 1752
- 24 M. RUBIN, W. D. PAIST et R.C. ELDERFIELD, *J. org. Chem.* 1941, 6, 260
- 25 R.G. LINVILLE et R.C. ELDERFIELD, *J. Org. Chem.*, 1941, 6, 270
- 26 J. TORREY et R. C. ELDERFIELD, *J. Org. Chem.*, 1941, 6, 289
- 27 E. R. MARSHALL, J.A. KUCK et R. C. ELDERFIELD, *J. Org. Chem*, 1942, 7, 444
- 28 E. R. BLOUT et R.C. ELDERFIELD, *J. org. Chem.*, 1943, 8, 29
- 29 W. S. KNOWLES, J.A. KUCK et R.C. ELDERFIELD, *J. Org. Chem.*, 1942, 7, 374
- 30 W. D. PAIST, E.R. BLOUT, F.C. UHLE et R.C. ELDERFIELD, *J. Org. Chem.* 1941, 6, 273
- 31 N.R. CAMPBELL et J. H. HUNT, *J. Chem. Soc.*, 1951, 214, 956
- 32 J. SCHMITT, M. SUQUET, P. COMOY, J. BOITARD, G. CALLET, T. CLIM et J. LE MEUR, *Bull. Soc. Chim.*, 1966, 953
- 33 Brevet Spécial de Médicament - n° 3 925M- PV n° 980 246 - Clin __ Byla, février 1966
- 34 J. SCHMITT, M. SUQUET, P. COMOY, J. BOITARD, G. CALLET, T. CLIM et J. LE MEUR, *Bull. Soc. Chim.*, 1966, 960
- 35 M. KLEIN et P. BOUYARD, *Ann., Anesth., Franç.*, 1969, 8
- 36 A.L. HYMAN, W. E. JACQUES et E. S. HYMAN, *Amer. Heart J.*, 1956, 52, 592
- 37 J. ORLOFF et M. BURG, *Amer. J. Physiol.*, 1960, 199, 49
- 38 K. REPKE, *Proc. Inter. Pharmacol. Meeting*, 1st, Stockholm, 1961, 3, 47
- 39 P. TRENDLENBURG, *Arch. exp. Path.*, 1909, 61, 256
- 40 R. GOTTLIEB, *Arch. exp. Path.*, 1918, 82, 1
- 41 H. GOLD, W. MODELL, N.T. KWIT, S.T. SHANE, C. DAYRIT, M.L. KRAMER, W. ZAHM et H.L. OTTO, *J. Pharmacol.*, 1948, 94, 39

- 42 W. MODELL et H. GOLD, J. Pharmacol., 1948, 94, 44
- 43 H. GOLD, Mc KEEN CATTEL et M.L. KRAMER, Fed. Proc., 1943, 2, 80
- 44 A. GROBER, Arch. exp. Path., 1913, 72, 317
- 45 C. S. FISCHER, A. SJOERDSMA et R. JOHNSON, Circulation, 1952, 5, 496
- 46 K. REPKE, Arch. exp. Path., 1958, 233, 271
- 47 F. HAUSCHILD, Pharmakologie und Grundlagen der Toxikologie, Leipzig, 1956, p 934
- 48 W. STRAUB, Biochem. Z., 1916, 75, 132
- 49 H. KILIANI, Ber. dtsch. chem. Ges., 1919, 51, 1613
- 50 A. WINDAUS, A. BOHNE et A. SCHWIEGER, Ber. dtsch. chem. Ges., 1924, 57, 1386
- 51 M. CLOETTA, Arch. exp. Path., 1926, 112, 261
- 52 W. A. JACOBS et A. HOFFMANN, J. Biol. Chem., 1927, 74, 787
- 53 K. K. CHEN et R. C. ELDERFIELD, J. Pharmacol., 1940, 70, 338
- 54 G. SEGRE, Arch. Int. Pharmacodyn., 1947, 75, 227
- 55 K. REPKE, Arch. exp. Path., 1959, 237, 155
- 56 J. J. ASHLEY, B. T. BROWN, G. T. OKITA et S. E. WRIGHT, J. Biol. Chem. 1958, 232, 315
- 57 J. F. MARTIN et S. E. WRIGHT, J. Pharmacol., 1960, 128, 329
- 58 K. REPKE, Naturwissenschaften, 1958, 45, 94, 366
- 59 K. REPKE, Arch. expt. Pathol. Pharmacol., 1958, 233, 271
- 60 K. REPKE, Arch. expt. Pathol. Pharmacol., 1959, 237, 34, 155
- 61 K. REPKE, Arch. expt. Pathol. Pharmacol., 1961, 241, 165
- 62 I. HERRMANN et K. REPKE, Experientia, 1963, 19, 472
- 63 K. REPKE et F. LAUTERBACH, Arch. exp. Path., 1960, 238, 46

- 64 A. YAMADA, Chem. and Pharm. Bull., Tokyo, 1960, 8, 18
- 65 M. OKADA et A. YAMADA, Pharm. Bull., Tokyo, 1956, 4, 420
- 66 K. REPKE, Arch. exp. Path., 1959, 237, 34
- 67 K. REPKE et F. LAUTERBACH, Verh. dtsh. Ges. Kreisl-Forsch., 1959, 25, 290
- 68 F. LAUTERBACH et K. REPKE, Arch. exp. Path., 1960, 239, 196
- 69 K. REPKE, Arch. exp. Path., 1960, 240, 2
- 70 F. LAUTERBACH et K. REPKE, Arch. exp. Path., 1960, 240, 45
- 71 J. CHR. SKOU, Biochim. et Biophys. Acta, 1957, 23, 394
- 72 E. T. DUNHAM et I.M. GLYNN, J. Physiol., 1961, 156, 274
- 73 E. ROTHLIN et M. TAESCHLER, Fortschritte der Kardiologie, 1956, 1
- 74 S. HAJDU et E. LEONARD, Pharmacol. Rev., 1959, 11, 173
- 75 R. F. FURCHGOTT et E. DEGUBAREFF, J. Pharmacol., 1958, 124, 203
- 76 K. S. LEE, D. H. YU, D. I. LEE et R. BURSTEIN, J. Pharmacol., 1961, 132, 139
- 77 A. WOLLENBERGER, Digitalis. E. GREY DIMOND, M. D., C. C. THOMAS publisher
Springfield, Illinois, U.S.A., 1957
- 78 G. A. KIEN et T. R. SHERROD, J. Cir. Res., 1960, 8, 188
- 79 J. A. KIEN, A. W. GOMOLL et T. R. SHERROD, Proc. Soc. Exp. Biol., N.Y.
1960, 103, 682
- 80 R. CALHOUN et T. HARRISON, J. Clin. Invest., 1931, 10, 139
- 81 I. M. GLYNN, J. Physiol., 1957, 136, 148
- 82 A. K. SOLOMON, J. Gen. Physiol., 1952, 36, 57
- 83 R. L. POST, C. R. MERRITT, C. R. KINSOLVING et C. D. ALBRIGHT,
J. Biol. Chem., 1960, 235, 1796
- 84 E. DUNHAM et I. GLYNN, J. Physiol., 1961, 156, 274

- 108 W. KOENIGS et E. KNORR, Sitzber. Math. naturw. Abt. Bayer. Alcad.
Wiss. Munchen, 1900, 30, 103. Ber, 1901, 34, 957
- 109 S. FUJISE et S. MITUI, Ber, 1938, 71B, 912
- 110 A. GROUILLER et H. PACHECO, Bull. Soc. Chim., 1966, p 987
- 111 LIBERMANN et MOYEUX, Bull. Soc. Chim., 1952, p 50
1956, p 166
- 112 KATAMNA, Thèse de Doctorat n° 552, Lyon
- 113 G. ZEMPLEN, L. FARKAS et A. BIEN, 1944, 77B, 452
- 114 KURT RANDERATH, Thin Layer Chromatography-Steroids p 123
- 115 SCHAFFER et HARTMAN, J. Biol. Chem., 1920, 45, 365
- 116 J. FRIED et R. C. ELDERFIELD, J. org. Chem., 1942, 7, 362
- 117 W. S. KNOWLES et R. C. ELDERFIELD, J. org. Chem., 1942, 7, 383
- 118 E. R. BLOUT et R.C. ELDERFIELD, J. org. Chem., 1943, 8, 37
- 119 R. ROBINSON et J. ALLAN, J. Chem. Soc., 1924, 125, 2192
- 120 J. E. BOWAN et T. S. WHEELER, J. Chem. Soc., 1950, 2, 1925
- 121 A. I. VOGEL, Pratical Organic Chemistry, Longmans, London 1956, IV,
107, p 677
- 122 A. I. VOGEL, Pratical Organic Chemistry, Longmans, London, 1956, IV,
107, p 677
- 123 W. BAKER, J. Chem. soc., 1933, p 1381
- 124 H. S. MAHAL et K. VENKATARAMAN, J. Chem. soc., 1934, p 1767
- 125 A. T. M. DUNNE et T. S. WHEELER, J. Chem. soc., 1950, 2, 1252
- 126 W. R. BIGGERSTAFF et A. WILDS, J. Amer. Chem. Soc., 1949, 71, 2132
- 127 F. ARNDT et B. EISTERT, Ber, 1935, 68, 200
- 128 W. BRADLEY et R. ROBINSON, J. Chem. soc., 1928, p 1310

- 85 S. HAJDU et E. LENOARD, Pharmacol. Rev., 1959, 11, 173
- 86 S. RINGER, J. Physiol., 1883, 4, 370
- 87 A. J. CLARK, J. Physiol., 1912, 47, 66
- 88 A. M. SHANES, Pharmacol. Rev., 1958, 10, 59
- 89 A. CSAPO, Ann. N.Y. Acad. Sci., 1959, 81, 453
- 90 W. WILBRANDT et H. KOLLER, Helv. Physiol. Acta, 1948, 6, 208
- 91 R. NIEDERGERKE et H. LUTTGAW, Nature, Lond., 1957, 179, 1066
- 92 R. NIEDERGERKE, J. Physiol., 1956, 134, 569
- 93 M. MOULIN et W. WILBRANDT, Experientia, 1955, 11, 72
- 94 J. B. KAHN, J. Pharmacol., 1958, 123, 263
- 95 H. E. HUXLEY et J. HANSON, Structure and Function of Muscle.
Academic Press. New York 1960
- 96 K. S. LEE, D. H. YU, D. I. LEE et R. BURSTEIN, J. Pharmacol., 1961,
132, 139
- 97 W. WILBRANDT et R. CAVIZEL, Helv. Physiol. Acta. 1954, 12, C40
- 98 F. SULSER, Wiener, Med. Wschr. n 1958, 108, 809
- 99 K. REPKE, Klin. Wschr., 1964, 42, 157
- 100 H.J. PORTIUS et K. REPKE, Mber. Dt. Akad. Wiss., 1963, 5, 193
- 101 H.J. PORTIUS et K. REPKE, Arch. expt. Pathol. Pharmacol., 1962, 243,
335
- 102 K. REPKE, Proc. Intern. Pharmacol. Meeting., 2nd, Prague, 1965, 4, 65
- 103 K. REPKE et J. H. PORTIUS, Experientia, 1963, 19, 452
- 104 H. J. PORTIUS et K. REPKE, Arzneimittel. Forsch., 1964, 14, 1073
- 105 W. KLAUS et G. KUSCHINSKY, Arch. expt. Pathol. Pharmacol., 1964, 244, 107
- 106 M. KLEIN, Thèse Doc. Med., Montpellier, 1966
- 107 P. BOUYARD et M. KLEIN, Journal de Médecine de Montpellier, Mai 1967

- 129 STEIGER et REICHSTEIN, *Helv. Chim. Acta*, 1937, 20, 1164
- 130 A.I. VOGEL, *Practical Organic Chemistry*, Longmans, London, 1956, p 971
- 131 BARCZAI, MARTOS et F. KOROSY, *Nature* 1950, n° 4192, 369
- 132 A. SCHWARTZ, J. C. ALLEN et S. HARIGAYA, *J. Pharmacol. Exp. Therapeut.*, 1969, 168, n° 1, 31
- 133 T. AKERA, F. S. LARSEN et T. M. BRODY, *J. Pharmacol. exper. Therapeut.*, 1969, 170, n° 1, 17
- 134 K. BURTON, *Biochem. J.*, 1959, 71, 388
- 135 C. H. FISKE et Y. SUBBA ROW, *J. Biol. Chem.*, 1925, 66, 375
- 136 T. SZELL, L. DOZSAI, M. ZARANDY et K. MENY HARTH, *Tetrahedron*, 1969, 25, 715.

TABLE DES MATIERES

	Page
1 - Introduction - Etat des connaissances actuelles sur la Chimie et la Pharmacologie des Cardénolides	1
2 - Synthèse des glucosides de désoxybenzoïnes	45
3 - Synthèse d'un glucoside de flavone lactonique	85
4 - Etude biochimique et pharmacologique des glucosides synthétisés	119
Conclusion	149
Bibliographie	153

